

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA DE LOS  
ESPERMATOZOIDES EN ALPACAS MACHO**

**(*Vicugna pacos*)**

**DE FERTILIDAD COMPROBADA**

**TESIS**

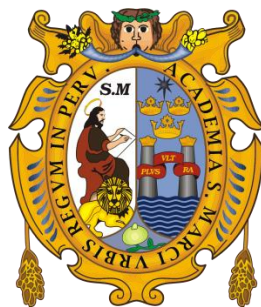
**para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en Zoología**

**AUTOR**

**OSCAR DIEGO EVANGELISTA VARGAS**

**Lima – Perú**

**2015**



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA DE LOS  
ESPERMATOZOIDES EN ALPACAS MACHO (*Vicugna pacos*)  
DE FERTILIDAD COMPROBADA

Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en Zoología

Asesora: MG. MARTHA VALDIVIA CUYA

Co-asesor: DR. ALEXEI SANTIANI ACOSTA

Bach. OSCAR DIEGO EVANGELISTA VARGAS

Lima - Perú

2015

Para mis abuelitos y Susan, que me cuidan  
desde el cielo; mis padres, que lo dan todo por  
nosotros; y Shirley, a quien tanto admiro.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, Leonor y Tomás, por haberme apoyado siempre de manera incondicional, si no fuera por ustedes no vería realizado ninguno de mis sueños. Cualquier logro o mérito obtenido es nuestro, absolutamente todo se lo debo a ustedes, los amo.

De manera especial agradezco a mi asesora y profesora la Mg. Martha Valdivia del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas y a mi co-asesor el Dr. Alexei Santiani del Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria, ambos de la UNMSM, por el gran apoyo brindado y permitirme formar parte de sus grupos de investigación durante mi estancia en sus laboratorios y el desarrollo de la presente tesis. Admiro infinitamente su labor como investigadores, gracias por las valiosas enseñanzas durante el desarrollo de mi trabajo de iniciación científica.

A mi hermana, Shirley Evangelista y su maravillosa familia, ella junto a Alexei desde el primer día de mi carrera me apoyaron de tantas maneras, siempre les estaré agradecido; a mis amados sobrinos María Isabel, Sofía y Daniel que me dan fuerzas cada día con todo su cariño. Hermanita, desde niño te admiro y junto a nuestros papás son mis 3 héroes; gracias por hacer realidad mi sueño de hacer ciencia a tu lado.

A Silvia Valenzuela, por el respaldo brindado desde el primer día, que tanto me ayudó a crecer personal y profesionalmente. Estoy orgulloso de ti, mi cariño y respeto por ti no tienen límites.

A mis tías Aurora, María, Nelida; mis tíos Julio, Pedro, Ramiro y Walter; mis primos Brayan y Walter; a todos por hacerme sentir un biólogo y profesional desde el primer día que pisé San Marcos.

Un agradecimiento especial a las personas que me ayudaron en el trabajo de laboratorio: A mis amigas Katherine Choez y Gloria Lévano, por su paciencia, valioso tiempo y compañía; trabajar con ustedes fue divertido y enriquecedor. A los ingenieros José Chahuin y Anibal Reyes por la ayuda en el manejo de las alpacas y las respectivas colectas. A la profesora Haydee Temoche, por el apoyo en el laboratorio, su amistad y los invaluable consejos que siempre me dio. También a Sergio Nolasco por su colaboración en parte de las pruebas estadísticas.

A todos mis amigos que me apoyaron y creyeron en mi durante toda la carrera hasta el día de hoy: Angel R., Augusto F., Carlos M., Jeimi P., José Augusto S., Luis P. y Miguel G., también biólogos de profesión; a Alfredo C., Brian Q., Cristina M., Diana S., Kevin A., Paola D. y Santiago, amigos de toda la vida. Agradezco a todos por siempre haber creído en mi y haber estado a mi lado cuando más los necesité.

A cada uno de los señores miembros de jurado por sus valiosas sugerencias, por su tiempo, paciencia y por el apoyo durante el proceso que implica la revisión de la tesis.

Solo quiero terminar con unas palabras para los jóvenes soñadores como yo: "En el camino de la vida, nuestra cabeza y corazón no puede trabajar por separado, deben complementarse en cada decisión; la cabeza debe orientarnos hacia qué sentido debemos dirigirnos, y el corazón es el que nos debe impulsar hasta lo más lejano del camino. Si seguimos esta ruta y no nos detenemos nunca, les aseguro que cumpliremos nuestros sueños".

¡Muchas gracias a todos!

# INDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. MARCO TEÓRICO .....	3
2.1. Alpaca ( <i>Vicugna pacos</i> ).....	3
a) Origen y evolución .....	5
b) Razas .....	5
c) Distribución.....	6
2.2. Importancia social y económica.....	7
2.3. Reproducción .....	7
a) Fisiología reproductiva del macho .....	8
b) Espermatogénesis.....	8
c) Técnicas de colecta .....	9
2.4. Espermatozoides .....	11
a) Evaluaciones sobre el estado de los espermatozoides.....	11
b) Criterios morfométricos de normalidad .....	13
III. OBJETIVOS.....	15
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
4.1. Materiales .....	16
a) Material biológico.....	16
b) Material de Laboratorio .....	16
c) Equipos .....	17

4.2. Metodología.....	17
a) Colección de la muestra .....	17
b) Procedimiento de análisis preliminar .....	18
c) Fijación con formaldehído.....	19
d) Tinción Papanicolau para espermatozoides .....	20
e) Análisis morfométrico de espermatozoides.....	21
f) Análisis estadísticos cuantitativos.....	24
g) Análisis estadísticos cualitativos.....	26
V. RESULTADOS .....	27
5.1. FORMAS DE CABEZA ESPERMÁTICA.....	27
5.2. PRUEBAS ESTADÍSTICAS CUANTITATIVAS.....	31
a) Principales pruebas estadísticas según las formas.....	33
b) Medias y Rangos según todas las formas. ....	39
5.3. PRUEBAS ESTADÍSTICAS CUALITATIVAS.....	42
a) En Cabeza.....	42
b) En Pieza Media y Cola Espermática. ....	43
5.4. RESULTADOS FINALES DE ANORMALIDADES .....	46
VI.- DISCUSIÓN .....	47
VII. CONCLUSIONES.....	52
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
X. ANEXOS .....	61

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Evaluaciones espermáticas preliminares luego de colectado el semen .....	28
<b>Tabla 2.</b> Número de espermatozoides según la forma de la cabeza.....	29
<b>Tabla 3.</b> Porcentaje de espermatozoides según la forma de la cabeza .....	30
<b>Tabla 4.</b> Resultados estadísticos según parámetros por cada forma.....	31
<b>Tabla 5.</b> Medias, DS y rango de distribución en forma Normal .....	39
<b>Tabla 6.</b> Medias, DS y rango de distribución en forma Alargada .....	39
<b>Tabla 7.</b> Medias, DS y rango de distribución en forma Corta .....	40
<b>Tabla 8.</b> Medias, DS y rango de distribución en forma Piriforme .....	40
<b>Tabla 9.</b> Medias, DS y rango de distribución en forma Redondeada .....	40
<b>Tabla 10.</b> Medias, DS y rango de distribución en forma Macrocéfala .....	41
<b>Tabla 11.</b> Medias, DS y rango de distribución en forma Microcéfala.....	41
<b>Tabla 12.</b> Porcentajes totales de defectos en cabeza espermática .....	42
<b>Tabla 13.</b> Frecuencias de espermatozoides completos .....	43
<b>Tabla 14.</b> Número total y porcentajes de espermatozoides, según sus defectos en cola y región media .....	44
<b>Tabla 15.</b> Porcentaje total de espermatozoides, según sus defectos en cola y pieza media.....	45
<b>Tabla 16.</b> Frecuencias finales de defectos según las formas.....	46
<b>Tabla 17.</b> Secuencia de inmersiones de semen fijado para la preparación de láminas en tinción Papanicolau.....	61
<b>Tabla 18.</b> Preparación de PBS 10X .....	62



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de los valores de longitud (Forma Normal) .....	34
Figura 2. Distribución de los valores de ancho (Forma Normal) .....	35
Figura 3. Distribución de los valores de perímetro (Forma Normal) .....	35
Figura 4. Distribución de los valores de área (Forma Normal) .....	36
Figura 5. Distribución de los valores de elipticidad (Forma Normal) .....	36
Figura 6. Distribución de los valores de factor forma p2a (Forma Normal) .....	37
Figura 7. Distribución de los valores de elongación (Forma Normal) .....	37
Figura 8. Distribución de los valores de regularidad (Forma Normal) .....	38
Figura 9. Microscopio con cámara de video incorporada .....	62
Figura 10. Macho de raza Suri con hembra de raza Huacaya .....	63
Figura 11. Procedimiento de eyaculación con la ayuda de un maniquí .....	63
Figura 12. Semen recién colectado en diferentes volúmenes .....	64
Figura 13. Formas de cabeza espermática: Normal (A), Alargada (B), Corta (C), Piriforme (D), Redondeada (E), Macrocefalia (F), Microcefalia (G) y Parámetros morfométricos (H) .....	65
Figura 14. Tipos de defectos en cola y región media espermática: Cola con 1 loop (A), cola con 2 loops (B), cola con 3 loops (C) y anomalía en la inserción de la región media (D) .....	66

## RESUMEN

La alpaca, es un camélido doméstico, económicamente importante en nuestro país por la calidad de su fibra. Al igual que en la mayoría de los mamíferos, se ha intentado caracterizar morfológicamente la estructura de sus espermatozoides, habiendo sido empleados sistemas CASA (iniciales en inglés, que al español significa: Asistencia computarizada de análisis de semen) en base a tinciones simples; por tal motivo, en el presente trabajo empleamos la tinción diferencial Papanicolau para resaltar las estructuras internas y externas. Es una técnica que no altera las superficies estructurales a diferencia de otros protocolos, adicionalmente de usar nuevos programas informáticos que permiten una biometría más precisa, y con menor margen de error.

Cada estructura ha sido caracterizada biométricamente, según esto se desarrollaron pruebas cualitativas (es decir, que identifican solo normalidad o anormalidad) para cabeza, región media y cola; así como pruebas cuantitativas tan solo para cabeza, con la finalidad de encontrar parámetros numéricos que nos permitan diagnosticar cada subpoblación espermática de acuerdo a su forma. Las formas de cabeza (Normal, alargada, corta, piriforme, redondeada y con macrocefalia y microcefalia) fueron delimitadas mediante parámetros básicos y derivados, cuyos rangos y medias nos permiten representar numéricamente cada una de las mencionadas formas.

En cada uno de los análisis de los eyaculados, se superó el valor predictivo del criterio estricto de Tygerberg (Kruger *et al.*, 1986; 1987), diseñado para humanos, que establece que el límite porcentual de espermatozoides normales para ser considerados fértiles es del 4% y así reafirmar, mediante la morfología, que los machos de fertilidad comprobada de la población en estudio, son aptos para la reproducción.

**Palabras clave:** Alpaca, espermatozoide, tinción Papanicolau, morfología y biometría.

# **I. INTRODUCCIÓN**

La alpaca es un mamífero doméstico de la familia Camelidae de gran importancia económica por la finura de su fibra. En el ámbito de la producción animal, el semen de los machos de esta especie cuenta con características muy diferentes a las de otros mamíferos, como baja concentración de espermatozoides, un alto porcentaje de espermatozoides anormales y un plasma seminal muy viscoso que dificulta el manejo de las muestras seminales, que a su vez no permite un veloz desplazamiento de los espermatozoides; siendo de alguna manera, factores limitantes para estudios como son la criopreservación de espermatozoides, entre otros.

Uno de los principales objetivos en este ámbito, es contar con machos de fertilidad comprobada; es por ello, importante tener la capacidad de determinar el potencial fértil de un macho mediante la evaluación de su calidad espermática. Maroto Morales (2012) sugiere que la morfología espermática debe ser identificada como una característica útil para predecir esta capacidad fecundante.

En general, pocas son las especies de mamíferos cuyos espermatozoides han sido completamente descritos morfométricamente, siendo predominantes los estudios morfométricos de cabeza espermática, habiéndose encontrado variaciones a nivel intra e inter-sujeto.

En alpacas, existe poca información en este aspecto, siendo posible que la caracterización espermática sea un factor complementario a otros estudios, que propicie un mayor avance en las biotecnologías reproductivas. Por lo tanto, es necesario conocer la fisiología y morfología de los espermatozoides en esta especie que es importante económicamente para nuestro país por la calidad de su fibra.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Alpaca (*Vicugna pacos*)

Los camélidos sudamericanos pertenecen a una familia de mamíferos ungulados (Camelidae) emparentados con los camellos que habitan África y Asia. Se distinguen por algunas características típicas (De Lamo, 2011) como:

- No tienen cuernos;
- Presentan dientes caninos verdaderos, separados de los premolares por un espacio llamado diastema, tanto en el maxilar como en la mandíbula;
- Una estructura anatómica de la cadera que les permite flexionar las patas debajo del tronco;
- La presencia de una uña en cada falange (en lugar de pezuña) de cada pata y una almohadilla plantar en cada dedo, entre otras características (Wheeler, 1995). Al igual que los rumiantes, no tienen piezas dentarias (incisivos) en el maxilar superior, lugar que se encuentra recubierto por tejido conectivo (rodete dentario).

La familia se divide en las tribus Camelini y Lamini, distribuyéndose el primero en Asia y África e incluyendo al camello *Camelus bactrianus* (presenta dos jorobas) y al dromedario *Camelus dromedarius* (con una joroba), y siendo la tribu Lamini la que se distribuye en Sudamérica (Gauthier-Pilthers y Dagg, 1981).

Para los camélidos sudamericanos (tribu Lamini), existen 4 especies, siendo dos de ellos silvestres, el guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*), y dos formas doméstica, la llama (*Lama glama*) y la alpaca (*Vicugna pacos*). El análisis combinado de variaciones cromosómicas y moleculares demostraron una alta similitud genética entre alpacas y vicuñas, así como entre llamas y guanacos (Marín *et al.*,

2007). Las cuatro especies poseen características comunes, como la presencia de glándulas metatarsianas, labio leporino, utilización de estercoleros o bosteaderos comunes, organización social polígama, ausencia de marcado dimorfismo sexual, ovulación inducida con la producción de una sola cría por parto o estación reproductiva (Wheeler, 1991). El análisis cromosómico de las cuatro especies, indica un valor de  $2n=74$  para todas; encontrándose finas y consistentes diferencias en los brazos cortos del cromosoma 1, separando a los guanacos y llamas, de las vicuñas y alpacas (Marín *et al.*, 2007).

La alpaca, es un camélido sudamericano que se clasifica taxonómicamente en:

Orden: *Artiodactyla owen*, 1848

Suborden: *Tylopoda illiger*, 1811

Familia: *Camelidae gray*, 1821

Tribu: *Lamini webb*, 1965

*Lama pacos* (Linnaeus, 1758). Nombre vulgar: alpaca.

Es la especie más pequeña de los camélidos domésticos, y comparte muchas características morfológicas con la vicuña (Marín *et al.*, 2007), teniendo un peso aproximado de entre 55 y 65 kg. La fibra del cuerpo de la alpaca tiene hasta 50 cm. de largo, con diámetro de 12 a 28 micrómetros, que es más resistente que la lana de oveja y con un alto costo en el mercado internacional.

La domesticación de este mamífero data de hace 6000 a 7000 años de antigüedad en los Andes peruanos, sugiriendo a la vicuña como ancestro de la alpaca (Kadwell *et al.*, 2001), siendo esta especie finamente criada por la gran importancia económica de la fibra que produce (Nowak, 1991).

### **a) Origen y evolución**

Los camélidos tuvieron un origen ancestral durante el Eoceno en América del Norte, hace unos 45 a 40 millones de años y fueron unas de las primeras familias de artiodáctilos modernos. Al final de este período, se dio la dispersión a otros continentes, hace solo 2 a 3 millones de años; un grupo migró a través del estrecho de Bering a Asia y África, y otro grupo a través del Istmo de Panamá llegó a Sudamérica, originando sucesivas transformaciones evolutivas. Los ancestros de los actuales camélidos que se originaron en América del norte, finalmente se extinguieron.

Para el caso de las alpacas, su origen ha sido históricamente material de controversia (Wheeler, 2005), debido principalmente a la alta tasa de hibridación entre estas formas y a las dificultades en la interpretación de los restos zooarqueológicos (Kadwell *et al.*, 2001), detectándose desde hace 6000 a 5500 años las primeras alpacas (Wheeler, 1984, 1995, 2000).

La morfología de los incisivos, características de pelaje, patrones de conducta, así como análisis moleculares, han contribuido a la investigación del origen de las formas domésticas, sugiriendo que las llamas y las alpacas se habrían originado a partir de guanacos y vicuñas, respectivamente. Siendo la comparación de la morfología de los incisivos en restos arqueológicos de la puna peruana, lo que permitió concluir que las alpacas eran formas domésticas de las vicuñas (Wheeler, 1984, 1995).

### **b) Razas**

Se tiene 2 razas en esta especie: Huacaya y Suri (Figura 10). La primera se caracteriza por la cobertura total del cuerpo con fibras muy densas que además cubren piernas, frente y mejillas, llegando a formar un copete que puede cubrir los ojos. La fibra es intensamente ondulada y voluminosa que crece en forma

perpendicular al cuerpo, dándole una apariencia rizada. Esta es la raza más común, produciendo los individuos de alta calidad hasta 12 libras de fibra al año.

La raza Suri presenta una cobertura de fibras de aspecto más sedoso, con una apariencia lacia y de mayor crecimiento en largo y, debido a su estructura, cae desde la línea media a ambos lados de cuerpo (De Lamo, 2011).

### ***c) Distribución***

La distribución actual de las alpacas es producto de la domesticación hace 6000 años en la punas centrales de Perú (Wheeler, 1984). Abarca una franja desde el norte del Perú hasta el sur de Bolivia, con muy pocos individuos en el norte de Chile y noreste de Argentina (Wheeler, 1995). En el Perú los departamentos de Puno y Cusco son los que concentran la mayor cantidad de alpacas.

A pesar de la domesticación, los rasgos sociales de la alpaca son similares a los de la vicuña. En rebaños donde hay machos y hembras, los primeros establecen dominio con las mismas características de la poligamia de los otros Camélidos Sudamericanos (San Martín, 1991; De Lamo, 2011).

## **2.2. Importancia social y económica**

La fibra de alpaca es un producto altamente cotizado en el mercado nacional e internacional. Su uso se remonta desde los antiguos peruanos, quienes hicieron de este material todo un arte en su vida diaria; así se utilizó en la confección de prendas y artículos decorativos usados para actividades ceremoniales debido a sus propiedades textiles como son: la resiliencia, la retención del calor, el brillo, entre otros (Valcarcel, 2011).

Actualmente, la fibra de alpaca es el medio de sustento económico en muchas zonas andinas del Perú, prueba de ello es su comercialización permanente. También resulta muy atractivo en los negocios del sector textil, ya sea por la apreciación del vellón en muchos países del mundo, primordialmente, por sus características como son: la finura, el color y el peso. Según el IV Censo Nacional Agropecuario (INEI, 2012), la población de alpacas en el país alcanza un total de 3'685,516 individuos con una producción integral de 4,313 toneladas métricas de fibra al año.

## **2.3. Reproducción**

Las alpacas sólo producen una cría al año, con una gestación de 340 días en promedio y una duración de vida de entre 15 y 25 años.

Durante la cópula de los camélidos sudamericanos (CSA), la postura, la duración de la misma y el patrón de eyaculación, han sido limitantes para el ámbito reproductivo con un interés internacional, siendo necesario implementar el uso de biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos como la inseminación artificial (IA) para acelerar la propagación de animales genéticamente superiores, que son selectos por la riqueza de su fibra y carne (Giuliano *et al.*, 2008).



Para el análisis del eyaculado de cualquier mamífero, los parámetros a evaluar son: volumen, color, aspecto, pH, concentración de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides móviles y porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales (WHO, 2010).

#### ***a) Fisiología reproductiva del macho***

En el aspecto fisiológico, el semen de los CSA presenta características limitantes particulares propia de la especie, tales como baja concentración de espermatozoides, alto porcentaje de espermatozoides anormales, extrema filancia y un plasma seminal con alta viscosidad que dificulta el veloz desplazamiento de los espermatozoides (Banda *et al.*, 2010; Casaretto, Martínez *et al.*, 2012). La filancia se define como la capacidad de formación de hilo y es por lo tanto, una característica reológica diferente a la viscosidad, siendo independiente una de la otra (Giuliano, 2012). Estas limitaciones dificultan la implementación de biotecnologías tan básicas como la inseminación artificial con semen congelado.

#### ***b) Espermatogénesis***

La espermatogénesis es un proceso de diferenciación celular que se lleva a cabo en los testículos (gónadas) en el cual las espermatogonias, a través de varias divisiones meióticas y transformaciones citológicas, dan origen a las espermátides maduras (Mann y Lutwak-Mann, 1981).

Los espermatozoides son células haploides que tienen la mitad de los cromosomas que una célula somática. Se originan inicialmente a partir de las espermatogonias, que son las primeras células germinativas del testículo adulto y están localizadas en la membrana basal del epitelio seminífero. Después de varias mitosis dan origen a los

espermátocitos, que son células que entran en meiosis. El proceso de meiosis comprende dos divisiones. Las células previas a la primera división son los espermátocitos primarios, luego de ésta se convierten en espermátocitos secundarios. Las dos divisiones de cada espermátocito resultan en 4 células haploides, que son las espermátides. Las espermátides se van a diferenciar en espermatozoides a través del proceso denominado espermiogénesis (Mann y Lutwak-Mann, 1981; Guraya, 1987).

En resumen, los espermatozoides son células altamente especializadas producidas en los túbulos seminíferos de los testículos con la función de fecundar al oocito, siendo portadores de la información genética del macho. Con una membrana plasmática que no sólo ayuda a preservar la integridad celular, sino que también participa en los eventos de fusión de membrana asociados con la fecundación.

### ***c) Técnicas de colecta***

Cada uno de los métodos de extracción de semen en CSA presenta características particulares con ventajas y desventajas que hay que tomar en cuenta en la toma de decisiones (Giuliano, 2012).

Entre los métodos de colección de semen para los CSA, se tiene:

- La estimulación manual,
- La electroeyaculación (EE), que consiste en el uso de un aparato con electrodos introducido por el recto hasta la próstata, que producirá estimulaciones eléctricas crecientes por algunos minutos. Para esta técnica es necesario que el animal se encuentre anestesiado, usando generalmente xylazina y ketamina como anestésicos. Por tales motivos es la técnica empleada para colectar en animales silvestres (Watson, 1978), siendo bastante

usada por diversos autores (McEvoy *et al.*, 1992; Bourke *et al.*, 1995; Director *et al.*, 2004).

- El uso de la vagina artificial (VA), es mediante el empleo de un tubo especial adaptado con bandas de látex y llenadas con agua caliente que ejercerá cierta presión sobre el pene del camélido. Para mantener la temperatura constante, la vagina artificial es enteramente cubierta con una frazadilla eléctrica, controlándose la temperatura ideal que permita simular la cópula con la hembra. Siendo esta técnica también empleada por diversos autores (Sumar, 1991; Lichtenwalner *et al.*, 1996; Bravo *et al.*, 2000, Alarcón *et al.*, 2012).

En el estudio desarrollo por Giuliano *et al.* (2008), establecieron diferencias entre los métodos de colecta por electroeyaculación y por uso de vagina artificial, siendo el primero el que contó con una mayor proporción de colecciones de semen exitosas, habiendo diferencias significativas entre ambos métodos para volumen, movilidad espermática, espermatozoides vivos y membrana funcional. En la investigación de Director y colaboradores (2004), también se contrastaron ambas metodologías, sin haber diferencias significativas en el volumen de los eyaculados.

Para la colecta mediante VA, se puede hacer uso ya sea de una hembra receptiva o de un maniquí, siendo el uso del primero una ayuda para incrementar la libido de los machos. A su vez, la posición adoptada por la hembra minimiza el movimiento y facilita la colecta, pudiendo obtenerse mejores características de volumen, movilidad, concentración y porcentaje de espermatozoides vivos (Dávalos y Olazábal, 2002). En el caso de la presente investigación, el empleo de cada apoyo no fue una variable trabajada, ya que su uso dependió de las preferencias de cada macho en las colectas.

Los métodos basados en fundas artificiales, son útiles generalmente sólo como métodos para evaluación seminal, siendo un motivo por el cual en esta investigación se colecta mediante el uso de la VA. El uso de esta metodología también se justifica

en el empleo de animales domésticos, por requerir un entrenamiento para su uso, técnica que sería imposible de emplear en animales silvestres.

## **2.4. Espermatozoides**

### ***a) Evaluaciones sobre el estado de los espermatozoides***

En la biotecnología reproductiva, uno de los principales objetivos es contar con machos de fertilidad comprobada, mediante la evaluación de su calidad espermática. Según Maroto (2012), la morfología espermática es una característica útil para predecir la capacidad fecundante, basándose en las formas y medidas de las estructuras corporales espermáticas para poder clasificarlas, permitiendo detectar anomalías en la cabeza, pieza intermedia y cola, defectos acrosomales específicos o variaciones del tamaño de las cabezas.

Los *sistemas automáticos de análisis de imágenes* (CASA, por sus siglas en inglés) y los sistemas basados en citometría de flujo, dan la ventaja de estudiar las características de los espermatozoides, teniendo un especial interés en la morfología. Lo ideal sería una mayor investigación para que estas pruebas determinen de forma más precisa la fertilidad en las muestras seminales.

El sistema CASA se emplea como sistema de gestión y análisis de los parámetros más importantes del semen; consta de un microscopio óptico con cámara digital y una computadora con el software. Se encarga de proveer mediciones más objetivas y confiables de la movilidad y morfología espermática. Sin embargo, es de alto costo y es necesaria una exacta calibración (Verstegen *et al.*, 2002).

Investigaciones previas en morfometría espermática se desarrollaron en varias especies de mamíferos como en equinos (Ball & Mohammed, 1995; Casey *et al.*, 1997), porcinos (González Villalobos *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2012), ovinos (Sancho

*et al.*, 1998; Bravo Delgado, 2010; Castillo Lalaguna, 2012; Maroto, 2012), caprinos (Hidalgo Prieto, 2004), bovinos (Gravance *et al.*, 1996), canino (Jurado *et al.*, 2008), en Macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*) (Gago *et al.*, 1998) y en humanos (Pérez-Sánchez *et al.*, 1994; Auger, 2010) han demostrado la importancia del uso de sistemas computarizados de análisis de imágenes (Verstegen *et al.*, 2002),

Como principal referencia, se cuenta con el estudio desarrollado por Buendía y colaboradores (2002), que caracteriza morfométricamente y clasifica a las cabezas de espermatozoides de alpaca mediante el uso de la tinción Hemacolor, que es comúnmente utilizada para diagnóstico celular en medicina humana y reduce el período de tinción clásico a una tinción de 2 minutos, a partir de la interacción molecular entre el colorante Eosina Y y un complejo Azul B. Cabe resaltar que para el análisis se empleó el Sperm Class Analyzer (SCA), un sistema CASA que requiere de una calibración previa para especies poco trabajadas como es el caso de alpacas. Teniendo en cuenta que es un sistema automático, en el aspecto morfométrico hay la posibilidad que muestre algunas diferencias con mediciones hechas manualmente, que idealmente presentarían un menor margen de error.

El análisis de la morfología espermática mediante el uso del microscopio óptico nos puede brindar información viable sobre la estructura del espermatozoide, siempre y cuando se use un método de tinción que realce correctamente las estructuras espermáticas externas, con el propósito de identificar y describir diferentes anomalías que mediante otros tipos de tinciones no serían comúnmente detectadas, pudiendo erradamente ser consideradas por estas como morfológicamente normales.

En el presente trabajo, la finalidad es obtener parámetros espermáticos para facilitar la estimación de la calidad seminal, mediante la identificación de los patrones morfológicos normales en espermatozoides de alpaca por uso de la tinción

Papanicolau, que según el estudio desarrollado por Aksoy *et al.* (2012) en espermatozoides de humanos, donde se emplearon diferentes métodos de tinción, la tinción Papanicolau con la hematoxilina eosina (HE) son consideradas como buenas técnicas para estudios de morfología espermática, junto al Azul de Toluidina (AT) y el método de Shorr, habiéndose probado también Giemsa, tinción de Wright, Hematoxilina Férrica de Weigert, Anaranjado G, tinción eosina-anilina, método de Berg, tinción verde brillante, anaranjado de acridina y tinción verde de Janus. Mencionando también que con la técnica de Shorr y Papanicolau se obtuvieron mediciones similares, sugiriendo el uso de la última por diferenciarse claramente el acrosoma.

Por lo tanto, se usará la tinción Papanicolau con el propósito de tener un análisis morfométrico de mayor precisión, y se prevé que la información obtenida permitirá estimar la capacidad fértil del macho analizado el semen con una mayor exactitud que con otras tinciones. Cabe resaltar que los métodos de tinción pueden alterar la estructura morfológica, variando los valores de medición.

Mediante el uso de esta tinción, se obtuvieron resultados que brindaron información detallada acerca de la morfología e integridad de la célula espermática, que permitió resaltar notoriamente todo el perímetro de la célula y de esta manera, obtener mediciones con un mínimo margen de error.

#### ***b) Criterios morfométricos de normalidad***

En el análisis morfológico de espermatozoides humanos, existe el criterio estricto de Tygerberg, también conocido como criterio de Kruger (Kruger *et al.*, 1986; 1987); que mediante parámetros morfológicos de la cabeza, región media y cola del espermatozoide determina su normalidad, siendo también posible aplicar estos parámetros a otros mamíferos, como en presente trabajo donde es aplicado a

espermatozoides de alpacas. Entonces, según el mencionado Criterio, un espermatozoide se considera normal si reúne las siguientes condiciones morfológicas:

- Forma de cabeza ovalada,
- ausencia de vacuolas o muescas en la cabeza,
- acrosoma presente en el 40-70% de la superficie de la cabeza,
- citoplasma residual en la pieza intermedia inferior al 30% de la superficie de la cabeza,
- inserción axial del flagelo a la cabeza y
- existencia de un único flagelo recto y uniforme.

Este esquema sugiere que cualquier manifestación ajena a esta se considere anormal (Menkveld *et al.*, 1990; WHO, 2010).

Para ser considerados fértiles, según este criterio, anteriormente debían tener un porcentaje de espermatozoides normales mayor al 14%, esto fue determinado por estudios de las características morfológicas como factores pronóstico correlacionándolas con las tasas de fertilización *in-vitro* (Kruger *et al.*, 1986; 1987). Actualmente, el rango porcentual de espermatozoides normales para ser considerados fértiles es del 4%, también por el valor predictivo del criterio estricto de Tygerberg (Lindheim *et al.*, 1996; Montanaro-Gauci *et al.*, 2001; Van Waart *et al.*, 2001).

### III. OBJETIVOS

#### ***a. Objetivo general***

- Caracterizar morfológicamente los espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) en machos de fertilidad comprobada.

#### ***b. Objetivos específicos***

- Estandarizar la técnica de tinción Papanicolau en espermatozoides de alpaca previamente fijados.
- Tipificar la normalidad de la morfología espermática, según el criterio estricto de Tygerberg.
- Analizar la variabilidad morfométrica en cabeza de espermatozoides de alpaca, entre los eyaculados de los machos del grupo de estudio.
- Identificar y clasificar a las diferentes subpoblaciones de espermatozoides de alpaca por la morfometría de sus cabezas.
- Analizar los tipos de flagelo y anormalidades de la pieza media presentados en la población espermática del estudio.



## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Materiales

#### **a) *Material biológico***

El material biológico empleado fue semen de alpaca (*Vicugna pacos*) de 10 machos adultos provenientes de Cerro de Pasco como parte de un proyecto de investigación con el canon, sobre canon y regalías de la Región Pasco en el que participa la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV - UNMSM). Dichos animales presentaron entre 4 - 7 años de edad, siendo de fertilidad comprobada, con crías registradas de las campañas reproductivas anteriores. Para la colecta, estos machos se encontraron en el departamento de Lima.

#### **b) *Material de Laboratorio***

- Colecta de semen:

Vagina artificial, bolsas de aguas, una frazadilla eléctrica y tubos de plástico.

- Evaluación espermática preliminar:

Laminas cubreobjetos y portaobjetos de vidrio, cámara de Neubauer, alcohol de 96%, eosina y azul de metileno.

- Fijación de muestras:

Micropipetas de 10 - 100  $\mu$ L y de 100 - 1000  $\mu$ L con sus respectivos tips, Buffer fosfato salino 0.1 M (PBS), solución de formaldehído para Biología Molecular al 37% en H<sub>2</sub>O (F8775 Sigma-Aldrich) y centrífuga.

- Tinción Papanicolau modificada para espermatozoides de alpaca:

Etanol (al 50%, 80%, 95% y 100%), etanol ácido, agua destilada, hematoxilina de Harris, Orange stain G-6 y green stain EA-50.

- Montaje de las láminas:

Xilol: alcohol (1:1), xilol y Bálsamo de Canadá (WHO, 2010).

### ***c) Equipos***

- Centrifuga

- Microscopio óptico modelo LW Scientific i4 Series con una cámara incorporada de modelo OmniVID LW Scientific con una máxima resolución de 8 megapíxeles,

- Computadora portátil HP Core i3 con los software MicroCap V 3.0, y Quick Photo MICRO 3.0.

## **4.2. Metodología**

### ***a) Colección de la muestra***

La metodología empleada para la colección de semen fue mediante el uso de un maniquí como señuelo, al que se acopló una vagina artificial (42°C) cubierta con una frazadilla eléctrica, con el fin de mantener la temperatura constante durante todo el tiempo que dura la cópula. La ventaja de realizar este tipo de colecta, es de no tener la necesidad de contar con hembras en celo. Las alpacas fueron previamente entrenadas para la colecta de semen mediante esta metodología (Sumar y Leyva, 1981; Bravo *et al.*, 1997; Dávalos y Olazábal, 2002) (Figura 11).

En algunas de las colectas, se emplearon hembras para estimular el libido del macho y ubicarlo en la postura de cópula, esto no implicó diferencia alguna en la muestra, así que no se tomó en cuenta ningún parámetro con respecto a esto.

### ***b) Procedimiento de análisis preliminar***

Inmediatamente después de colectado el semen, se procedieron a evaluar los parámetros de rutina, como los exámenes macroscópicos iniciales (apariencia del eyaculado, volumen de semen, pH del semen) y las evaluaciones microscópicas iniciales (movilidad, concentración, vitalidad y morfología de los espermatozoides). Las evaluaciones microscópicas se desarrollaron con la ayuda de un microscopio óptico modelo LW Scientific i4 Series con una cámara incorporada de modelo OmniVID LW Scientific, que permite una máxima resolución de 8 megapíxeles. Para los mencionados parámetros se trabajó con el objetivo de 40X, empleándose el software MicroCap V 3.0 en una Laptop HP Core i3 para la captura de tomas fotográficas. Por cada lámina se observaron 20 campos en cada prueba, y los análisis empleados se especifican a continuación:

- El semen fue colectado en tubos de plástico estéril de tipo Falcon® graduados en mL para medir el volumen, los cuales se mantuvieron cubiertos por las manos para que se mantuvieran calientes por el calor corporal, con el propósito de no alterar las evaluaciones.
- Para medir el pH, se colocó una gota de semen sobre una tira reactiva Merck®.
- La movilidad se estimó colocando una gota de la muestra sobre un portaobjetos, previamente calentado en una platina térmica a 37°C y luego de hacer un extendido se observó al microscopio óptico con el objetivo de 40X, calculando el porcentaje de espermatozoides móviles de un total de 200.
- La concentración de espermatozoides se determinó mediante el conteo por cámara

de Neubauer a 40X, para ello la muestra se diluyó en una proporción de 1:20 (10 mL de la muestra y 190 mL de PBS 1X) y se contaron los espermatozoides presentes en 5 de los 25 cuadros de la cámara. El volumen ocupado por los 5 cuadros contados, multiplicado por el factor de dilución (20) y el factor de la cámara (10,000) dará la concentración espermática por  $\mu\text{L}$ . En el caso que la muestra haya sido muy concentrada, se procedió a diluir en una proporción de 1:200, cambiando para el cálculo el factor de dilución de la concentración (200).

- Para evaluar la vitalidad se empleó el objetivo de 40X, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la muestra y se le agregaron 10  $\mu\text{L}$  de Eosina al 2%, homogenizándose la muestra e incubándola por un minuto. El cálculo será porcentual a partir de un total de 200 espermatozoides contados por frotis, siendo los muertos aquellos que se tiñan con la eosina.

- Para el análisis de la morfología espermática, una gota de la muestra fue finamente extendida para luego dejarse secar, se sumergió 1 minuto en alcohol de 96° como fijador, 1 minuto en eosina y 10 segundos en azul de metileno para luego ser enjuagado con un chorro de agua corriente. Se secó y observó al microscopio óptico con el objetivo de inmersión (100X), se contaron un total de 200 espermatozoides por frotis. Finalmente, los resultados se expresaron en porcentajes entre normales y anormales.

### ***c) Fijación con formaldehído***

Luego de ser evaluados, los espermatozoides se lavaron 2 veces en una centrífuga a 600 gravedades (2100 rpm) por 5 minutos con PBS 1X, con el propósito de separarlos del plasma seminal.

Como solución de fijación se empleó 1mL de formaldehído al 2% en PBS 10X con 7.4 de pH (Tabla 18), preparado en el momento. Las proporciones de la solución fueron 946  $\mu\text{L}$  de PBS 10X con 54  $\mu\text{L}$  de formaldehído al 37%.

La muestra fijada fue agitada por lapso de una hora para evitar la aglutinación de los espermatozoides, posterior a esto vuelve a ser centrifugada 2 veces a 600 gravedades por 5 minutos con PBS para ser lavada del formaldehído. Luego se procedió a añadir 1 mL de PBS al pellet de espermatozoides y se guardó en un tubo Eppendorf ® graduado para su refrigeración a 4°C.

#### ***d) Tinción Papanicolau para espermatozoides***

Se emplearon láminas portaobjetos, las cuales inicialmente fueron lavadas en alcohol de 96°, para luego dejarlas secar al ambiente. Posterior a eso, se sumergieron por un instante en la solución de Poly-L-Lisina al 0.1% (w/v) en H<sub>2</sub>O, que luego de secarse y adicionar una gota de los espermatozoides fijados permitió la adherencia de estos a la lámina.

Luego de tener la seguridad que los espermatozoides se encuentran adheridos a las láminas, se procedió a hacer la tinción Papanicolau, que es un método de tinción policrómico donde se utilizaron los colorantes Hematoxilina de Harris, Orange G y Green EA-50, intercalando con soluciones de etanol a diferentes concentraciones que hidratan, deshidratan y enjuagan a los espermatozoides, según el Manual de Laboratorio para el análisis y procesamiento de semen humano (WHO, 2010).

Según los pasos establecidos en el mencionado Manual, se probaron diferentes tiempos de inmersión durante cada paso de la tinción, con la finalidad de estandarizar un nuevo protocolo de tiempos de fijación, ideales para espermatozoides de alpaca previamente fijados, hasta obtener una secuencia de tiempos que nos permita colorear óptimamente las estructuras internas y externas para la toma de nuestros datos cualitativos y cuantitativos (Tabla 17).

Las funciones que cumple cada compuesto en esta tinción Papanicolau es:

- Etanol, para fijar las células y también para deshidratarlas;
- etanol graduado, para rehidratar gradualmente las laminas fijadas y permitir la tinción soluble en agua de hematoxilina de Harris;
- agua destilada, para rehidratar las láminas desecadas y permitir la tinción soluble en agua de hematoxilina de Harris;
- hematoxilina de Harris, para teñir el núcleo de azul,
- agua corriente para eliminar el exceso de hematoxilina nuclear,
- etanol acido, para remover el colorante no especifico adherido al citoplasma,
- agua corriente, para reducir la acidez y devolver el color azul al núcleo,
- etanol, para deshidratar las laminas y permitir la tinción con orange G y EA -50,
- Orange G, para teñir el citoplasma de rosa,
- EA - 50, para teñir el citoplasma de rosa y
- xilol, para permitir el uso de etanol-insoluble en los montajes (WHO, 2010).

#### ***e) Análisis morfométrico de espermatozoides.***

Las láminas montadas de espermatozoides bajo la tinción Papanicolau, fueron observadas en un microscopio óptico con cámara incorporada, que a su vez estuvo conectada a una computadora.

Se tomaron medidas de las cabezas espermáticas con los software MicroCap v.3.0 y Quick Photo MICRO 3.0 con el objetivo de 40X de aumento. Con el primer software se hizo el contraste de luces y se tomaron las fotos con la respectiva escala de medición, mientras con el otro se procedieron a tomar las medidas de las cabezas espermáticas de las fotos. A partir de las fotos, se determinaron también las anormalidades de la cabeza, pieza media y flagelo así como las respectivas anormalidades establecidas según los criterios del Manual de Laboratorio de la OMS (2010) y el Criterio Estricto de

Tygerberg (Kruger *et al.*, 1986; 1987), que mediante una serie de condiciones morfológicas determinaron la normalidad, delimitando a las siguientes como características defectuosas:

- Defectos de cabeza: Grande o pequeño, cónico, piriforme, redondo, amorfo, vacuolado (más de 2 vacuolas o más del 20% del área de la cabeza ocupado por áreas vacuolares sin teñir), vacuolas en la región post-acrosomal, área acrosomal pequeña o grande (menor del 40% o mayor al 70% del área de la cabeza), cabezas doble, o cualquier combinación de estos caracteres.
- Defectos de cuello y pieza media: Inserción asimétrica de la pieza media en la cabeza, gruesa o irregular, pronunciadamente curvada, anormalmente delgada, o cualquier combinación de estos caracteres.
- Defectos en la pieza principal: Cortos, múltiples, rotos, curvas bruscamente anguladas, de anchura irregular, o cualquier combinación de estos caracteres.

Para cada variable definida de los parámetros cuantitativos o cualitativos, se analizará un total de 200 espermatozoides por eyaculado. Para el caso de los cualitativos se hará las observaciones con el objetivo de 100X con aceite de inmersión.

Las variables cuantitativas se usan con relación a las dimensiones morfométricas de la cabeza. Se tomaron solo medidas de los parámetros básicos, y mediante el uso de fórmulas matemáticas se obtuvieron los parámetros derivados.

- Parámetros básicos: Área ( $A$ ,  $\mu\text{m}^2$ ), perímetro ( $P$ ,  $\mu\text{m}$ ), longitud ( $L$ ,  $\mu\text{m}$ ), ancho ( $W$ ,  $\mu\text{m}$ ).
- Parámetro derivados: Elipticidad ( $L/W$ ), factor forma  $p2a$  ( $p2a$ ,  $P^2/4\pi A$ ), elongación  $((L-W)/(L+W))$  y regularidad ( $\pi LW/4A$ ).

Las variables cualitativas a ser tomadas para nuestro análisis fueron tomadas en cuenta según las mencionadas características establecidas por los Criterios del Manual de Laboratorio de la OMS (2010) y el Criterio Estricto de Tygerberg (Kruger *et al.*, 1986; 1987):

- Para la forma de la cabeza: Se tomarán como ausencia (Normal) o presencia de defectos en forma (piriforme, redondo, amorfo, etc) y defectos ajenos a la forma (en cuanto a las vacuolas, región post-acrosomal, etc).
- Para la pieza media: Presencia o ausencia de defectos.
- Para la cola: Ausencia o Presencia de enrollamientos (en este caso, el número de enrollamientos en el caso de haberlos) y acortamiento.

Se tiene una perspectiva general de cómo están definidos los parámetros básicos, pero es necesario explicar el porqué se usan los parámetros derivados, que se originan a partir de los básicos:

- Elipticidad.- En geometría, es la medida de compresión de un círculo o esfera a lo largo de su diámetro para formar una elipse. Siendo la forma elíptica característica de los espermatozoides.
- Factor forma p2a.- Compara el perímetro de un objeto con relación a su área (Sailer *et al.*, 1996).
- Elongación.- Es un parámetro con relación al alargamiento de un cuerpo, que relaciona el largo con el ancho.
- Regularidad.- Un parámetro que relaciona el largo, ancho y área con la finalidad de definir si el cuerpo se aproxima a una forma geométrica no arbitraria, es decir, lo menos irregular posible.



#### **f) Análisis estadísticos cuantitativos.**

Para los análisis estadísticos se empleó el software SPSS para Windows (IBM® SPSS® Statistics. Version 22), considerándose para todas las pruebas a  $p < 0.05$  como estadísticamente significativa.

Para la Cabeza: Cada forma de las cabezas espermáticas tomada como variable cualitativa (Normal, alargada, corta, piriforme, redondeada, con macrocefalia y microcefalia), está basada en las formas propuestas por Buendía *et al.* (2002), y en este caso serán identificados mediante su comparación con el patrón establecido por nuestra parte (Figura 13). Inicialmente serán agrupadas según las mencionadas formas, a partir de un conteo de 200 cabezas espermáticas por eyaculado, y cuantificadas de manera tanto numérica como porcentual (Tablas 2 y 3).

Se desarrollaron pruebas estadísticas de manera independiente para los parámetros morfométricos básicos (Área, perímetro, longitud y ancho) y derivados (elipticidad, factor forma, elongación y regularidad), analizándose según todas las formas de cabeza. Las pruebas se desarrollaron mediante esta vía, con la finalidad de obtener estimaciones numéricas de los valores que delimitan las formas propuestas.

Primero se efectuó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si las variables tenían una Distribución Normal, con esto nos referimos a la probabilidad de que las distribuciones de variable continua se aproximen con más frecuencia a los fenómenos reales. La gráfica de su función tiene forma de campana y es simétrica respecto a un determinado parámetro estadístico, siendo llamada Función Gaussiana. Se trabajará con el nivel de significancia alfa al 5%, eso quiere decir que cuando se obtenga el valor de P en la prueba, y este sea menor a 0.05, la distribución de la variable de estudio diferirá de la distribución normal; mientras que al ser mayor a ese valor, la distribución de la variable en estudio no difiere de la distribución normal (es decir, la hipótesis nula es aceptada).

Luego se hallaron las medias, valores mínimo y máximo, desviación estándar, así como asimetría y curtosis, que son medidas de distribución que nos permiten identificar la separación o aglomeración de los valores de acuerdo a la frecuencia en que se encuentren, y nos permiten identificar numéricamente las características de distribución, sin la necesidad de reconocer la Normalidad por medio de gráficas.

La *Asimetría* nos permite definir si los datos se distribuyen de forma uniforme alrededor del punto central (media aritmética). Habiendo tres categorías:

- *Asimetría positiva*.- Cuando la mayoría de datos se encuentra por encima del valor de la media.  $g_1 > 0$  cuando los valores tienden a reunirse más en la parte izquierda de la media.
- *Asimetría negativa*.- Cuando la mayor cantidad de datos se encuentran por debajo de la media.  $g_1 < 0$  los valores tienden a reunirse más a la parte derecha de la media.
- *Curva simétrica*.- Cuando se distribuye aproximadamente la misma cantidad de valores en ambos lados de la media. Se tiende a tomar los valores que son cercanos a cero, ya sean positivos o negativos ( $\pm 0.5$ ).

Mientras mayor sea el número (positivo o negativo), mayor será la distancia que separa a la aglomeración de los valores respecto a la media.

Mientras que la *Curtosis* determina el grado de concentración que presentan los valores en la región central de su distribución. Teniendo también tres categorías:

- *Mesocúrtica* cuando  $G = 0$
- *Leptocúrtica* cuando  $G > 0$
- *Platicúrtica* cuando  $G < 0$

Cuando la distribución de los datos tiene el coeficiente de Asimetría de  $\pm 0.5$  y el coeficiente de Curtosis de  $\pm 0.5$ , se denomina una curva normal, es decir, los datos están distribuidos normalmente.

#### ***g) Análisis estadísticos cualitativos.***

Para la Cabeza: La mencionada forma Normal se tomará como ausente de defectos, cualquier otra forma será defectuosa. Para los defectos de la cabeza ajenos a su forma, se tomaron en cuenta el número de vacuolas o el porcentaje de su presencia en la región post acrosomal, el tamaño de la región acrosomal, las cabezas dobles o la combinación de estos caracteres. En los datos finales se tomaran en cuenta con presencia o ausencia de defectos y serán representados porcentualmente.

Para la Pieza Media: Los datos se tomaron en cuenta con presencia y ausencia de defectos, siendo también representados porcentualmente. Los defectos se identifican por la inserción asimétrica de la pieza media, la forma (grosor, irregularidad) o la combinación de los caracteres.

Para la Cola: La morfología de esta estructura también se representó porcentualmente por la presencia o ausencia de defectos, incluyendo también el número de enrollamientos en el caso de los defectuosos.

Por último, se juntaron todos los porcentajes obtenidos para tener una estimación de la frecuencia total de los espermatozoides defectuosos según cada estructura, siendo representado por medio de porcentajes del total. Además, se realizó una comparación con los resultados obtenidos en el análisis morfológico preliminar que se realizó inmediatamente después de colectado el semen.

## **V. RESULTADOS**

De los 10 machos que componían nuestro grupo de muestreo, solo fue posible efectuar colectas en 7 de ellos, de los cuales obtuvimos un total de 15 eyaculados.

Después colectado el semen, se evaluaron parámetros físicos y químicos, así como una evaluación morfológica preliminar a partir de pruebas de rutina que dieron valores iniciales, sirviendo para luego hacer un contraste con los resultados finales del trabajo (Tabla 1).

### **5.1. FORMAS DE CABEZA ESPERMÁTICA.**

Se trabajó con un total de 15 eyaculados, analizándose 200 espermatozoides de cada lámina preparada, los cuales fueron reconocidos por los diferentes patrones de forma establecidos: Normal, alargada, corta, piriforme y redondeada; así como los defectos más notorios como macrocefalia y microcefalia (Tablas 2 y 3).

**Tabla 1.** Evaluaciones espermáticas preliminares luego de colectado el semen.

NÚMERO	FECHA	MACHO	VOLUMEN	COLOR	pH	MOVILIDAD	CONCENTRACIÓN	MORFOLOGÍA	VITALIDAD
1	29/11/2013	17	7,5 mL	Terroso	8	45%	68 x 10(6)/mL	28% (anorm). 72% (norm)	40%
2	04/12/2013	16	3,5 mL	Turbio blanquecino	8,5	5%	66,5 x 10(6)/mL	/	6%
3	05/12/2013	2	5 mL	Turbio	8	35%	113 x 10(6)/mL	/	25%
4	05/12/2013	6	1 mL	Blanquecino	8,5	90%	388,5 x 10(6)/mL	/	63%
5	06/12/2013	Legolas	1 mL	Blanquecino	8	50%	400 x 10(6)/mL	19% (anorm). 81% (norm)	15%
6	06/12/2013	17	2,3 mL	Terroso	7	90%	210 x 10(6)/mL	24% (anorm). 76% (norm)	78%
7	10/12/2013	3	1 mL	Blanquecino	8,5	20%	20 x 10(6)/mL	29% (anorm). 71% (norm)	17%
8	10/12/2013	17	2,3 mL	Blanquecino	8	70%	/	/	39%
9	11/12/2013	2	2 mL	Blanquecino	8	70%	162 x 10(6)/mL	16% (anorm). 84% (norm)	63%
10	11/12/2013	16	4,5 mL	Blanquecino	8	25%	190 x 10(6)/mL	22% (anorm). 78% (norm)	21%
11	12/12/2013	6	2,3 mL	Terroso	8,5	15%	23 x 10(6)/mL	18% (anorm). 82% (norm)	13%
12	12/12/2013	9	1,5 mL	Transparente	8,5	50%	80 x 10(6)/mL	21% (anorm). 79% (norm)	39%
13	13/12/2013	Legolas	0,5 mL	Lechoso	7,5	70%			68%
14	13/12/2013	17	3 mL	Terroso	8	85%			80%
15	13/12/2013	3							

**Tabla 2.** Número de espermatozoides según la forma de la cabeza.

Lámina	Normales	Alargadas	Cortas	Piriformes	Redondeadas	Macrocefalia	Microcefalia	Total
<b>1</b>	87	48	17	22	17	6	3	200
<b>2</b>	91	43	8	29	14	10	5	200
<b>3</b>	93	45	3	37	10	7	5	200
<b>4</b>	101	34	5	19	18	21	2	200
<b>5</b>	94	42	5	22	19	15	3	200
<b>6</b>	94	36	1	18	37	6	8	200
<b>7</b>	103	30	2	23	27	7	8	200
<b>8</b>	92	39	2	23	12	5	27	200
<b>9</b>	87	34	3	43	13	14	6	200
<b>10</b>	108	23	9	23	20	12	5	200
<b>11</b>	97	29	8	16	8	39	3	200
<b>12</b>	98	35	1	42	14	4	6	200
<b>13</b>	106	43	4	18	14	13	2	200
<b>14</b>	103	27	2	13	14	9	32	200
<b>15</b>	104	19	6	13	26	27	5	200
<b>TOTAL</b>	1458	527	76	361	263	195	120	3000

**Tabla 3.** Porcentaje de espermatozoides según la forma de la cabeza.

Lámina	Normales (%)	Alargadas (%)	Cortas (%)	Piriformes (%)	Redondeadas (%)	Macrocefalia (%)	Microcefalia (%)	Total (%)
1	43.5	24	8.5	11	8.5	3	1.5	100
2	45.5	21.5	4	14.5	7	5	2.5	100
3	46.5	22.5	1.5	18.5	5	3.5	2.5	100
4	50.5	17	2.5	9.5	9	10.5	1	100
5	47	21	2.5	11	9.5	7.5	1.5	100
6	47	18	0.5	9	18.5	3	4	100
7	51.5	15	1	11.5	13.5	3.5	4	100
8	46	19.5	1	11.5	6	2.5	13.5	100
9	43.5	17	1.5	21.5	6.5	7	3	100
10	54	11.5	4.5	11.5	10	6	2.5	100
11	48.5	14.5	4	8	4	19.5	1.5	100
12	49	17.5	0.5	21	7	2	3	100
13	53	21.5	2	9	7	6.5	1	100
14	51.5	13.5	1	6.5	7	4.5	16	100
15	52	9.5	3	6.5	13	13.5	2.5	100
<b>TOTAL</b>	48.6%	17.5%	2.53%	12.03%	8.76%	6.5%	4%	100%

## 5.2. PRUEBAS ESTADÍSTICAS CUANTITATIVAS.

Cada uno de los parámetros básicos y derivados de cada tipo de forma en las cabezas espermáticas, fue sometido a la prueba de Kolmogorov-Smirnov, hallándose también las medias, los valores de rango mínimo y máximo, desviación estándar, asimetría y curtosis; según los mencionados parámetros morfológicos de la forma de las cabezas en todos los eyaculados.

**Tabla 4.** Resultados estadísticos según parámetros por cada forma.

Forma	Número	Parámetro	Media	Error estándar	Máximo	Mínimo	Desviación estándar	Asimetría	Curtosis
Normal	1458	Longitud	5.44	0.01	6.5	4.4	0.3837	0.068	-0.522
		Ancho	3.044	0.0064	3.9	2.3	0.2428	0.151	0.023
		Perímetro	13.64	0.0256	16.6	10.7	0.97881	-0.035	-0.357
		Área	12.658	0.0488	19.1	7.5	1.863	0.173	-0.208
		Elipticidad	1.793	0.0028	2.3478	1.4286	0.1101	0,083	-0.304
		p2a	1.177	0.0009	1.3336	0.9962	0.0367	0.387	0.663
		Elongación	0.282	0.0007	0.4026	0.1765	0.0282	-0.106	-0.453
		Regularidad	1.037	0.0024	1.3886	0.829	0.0928	0.528	-0.17
Alargadas	527	Longitud	5.738	0.0191	7.5	4.5	0.4381	-0.41	0.332
		Ancho	2.692	0.0111	3.5	2	0.2559	-0.086	-0.234
		Perímetro	13.614	0.0501	19	10.1	1.1512	-0.037	0.409
		Área	11.665	0.0914	22.9	6.3	2.0976	0.345	1.07
		Elipticidad	2.139	0.0062	2.7273	1.6667	0.1439	0.959	1.769
		p2a	1.277	0.0024	1.5212	1.1481	0.0560	0.828	0.971
		Elongación	0.361	0.0012	0.4634	0.25	0.0282	0.579	1.214
		Regularidad	1.054	0.0045	1.3987	0.8493	0.1045	0.501	-0.189
Corta	76	Longitud	4.982	0.0395	5.8	4.2	0.3444	0.223	-0.017
		Ancho	3.08	0.0332	3.7	2.4	0.2894	-0.018	-0.446
		Perímetro	13.005	0.1194	15.4	10.6	1.0413	-0.199	-0.504
		Área	11.883	0.2265	17	7.4	1.9749	0.015	-0.413
		Elipticidad	1.626	0.0159	2.1154	1.3243	1.3911	0.94	2.486
		p2a	1.141	0.0038	1.2328	1.0607	0.0336	0.811	1.002
		Elongación	0.236	0.0044	0.358	0.1395	0.0390	0.421	1.528
		Regularidad	1.025	0.0095	1.2442	0.8509	0.0836	0.319	-0.24



Piriforme	361	Longitud	5.58	0.0266	7.6	4.3	0.5059	0.225	0.624
		Ancho	2.941	0.0155	3.9	2.3	0.2944	0.14	-0.073
		Perímetro	13.566	0.0605	17.8	10.6	1.15	0.096	0.06
		Área	11.93	0.107	19	7.2	2.0325	0.368	0.129
		Elípticidad	1.910	0.0113	2.5833	1.4375	0.2158	0.636	0.462
		p2a	1.238	0.0038	1.6247	1.0944	0.0735	1.136	2.34
		Elongación	0.309	0.0026	0.4419	0.1795	0.0496	0.215	-0.104
		Regularidad	1.090	0.0051	1.4359	0.9035	0.0972	0.518	0.086
Redondeada	263	Longitud	5.07	0.0234	6.2	3.7	0.379	0.23	0.411
		Ancho	3.323	0.0148	4.1	2.7	0.2395	0.219	0.286
		Perímetro	13.231	0.0635	16.6	10.2	1.0293	0.189	0.467
		Área	12.652	0.1237	19.7	7	2.0054	0.491	0.75
		Elípticidad	1.528	0.0056	1.9	1.1935	0.0923	0.025	2.242
		p2a	1.108	0.0016	1.2634	1.0197	0.0275	0.866	3.781
		Elongación	0.207	0.0017	0.3103	0.0882	0.0291	-0.428	2.347
		Regularidad	1.057	0.0058	1.3329	0.8602	0.0948	0.345	-0.44
Macrocefalia	195	Longitud	6.57	0.0246	8.8	6	0.3432	2.408	10.736
		Ancho	3.148	0.0313	4.8	2.3	0.4369	0.844	0.346
		Perímetro	15.807	0.08	21.6	13.2	1.1171	1.814	6.818
		Área	15.817	0.2165	30.7	9.7	3.0235	1.722	5.543
		Elípticidad	2.121	0.0195	2.8462	1.575	0.2728	0.129	-0.475
		p2a	1.274	0.0067	1.5623	1.0752	0.0941	0.533	0.104
		Elongación	0.354	0.0040	0.48	0.2233	0.0567	-0.249	-0.529
		Regularidad	1.036	0.0062	1.2927	0.829	0.0875	0.57	-0.146
Microcefalia	120	Longitud	4.337	0.0257	5.2	3.4	0.281	-0.587	1.81
		Ancho	2.678	0.0349	3.7	1.9	0.382	0.197	-0.379
		Perímetro	11.198	0.082	13.3	8.5	0.8978	-0.339	0.012
		Área	8.803	0.153	12.8	4.8	1.6764	-0.014	-0.444
		Elípticidad	1.652	0.0237	2.4211	1.1892	0.2598	0.687	0.151
		p2a	1.149	0.0069	1.3927	1.039	0.0761	1.14	1.055
		Elongación	0.238	0.0065	0.4154	0.0864	0.0714	0.233	-0.388
		Regularidad	1.049	0.0107	1.3745	0.8648	0.1181	0.677	-0.294

Según los resultados mostrados en la Tabla 4, utilizamos los datos de Asimetría y Curtosis para corroborar los valores obtenidos en la prueba de Kolmogorov-Smirnov, con la finalidad de determinar numéricamente si existe Normalidad en la distribución de caracteres de los parámetros de formas.

Como se mencionó anteriormente, cuando los coeficientes de asimetría y curtosis están entre  $\pm 0.5$ , los datos están distribuidos normalmente. Entonces, en el caso de

las formas generales (Normal, alargada, corta, piriforme y redondeada), observamos que los parámetros básicos se mantienen dentro de una Distribución Normal o están muy aproximados a esto; mientras que los parámetros derivados en su gran mayoría no presentan una distribución normal, esto se debe a que la obtención de estos datos es a partir de fórmulas que emplean los parámetros básicos y que por lo tanto conllevan a una mayor variabilidad de los datos.

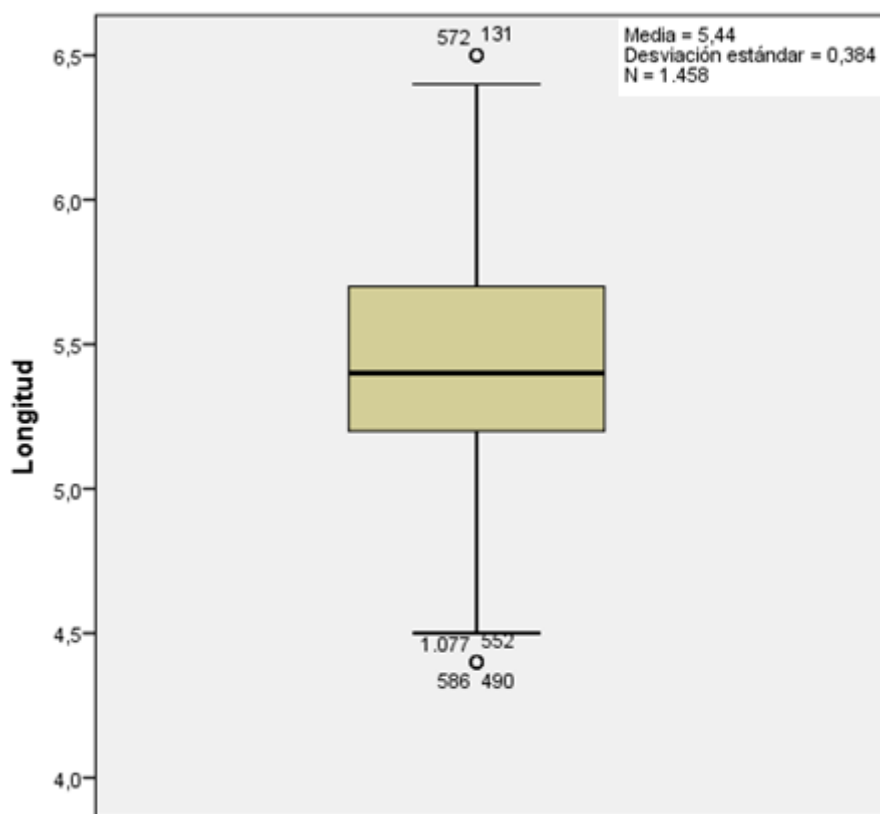
En cambio, la Macrocefalia y Microcefalia al representar anormalidades, tienen un rango de valores mucho mayor y con frecuencias más variables que en el resto de formas. Por eso, en la gran mayoría de sus parámetros (sean básicos o derivados), no se presenta una distribución normal de sus datos.

#### ***a) Principales pruebas estadísticas según las formas.***

Solo serán representados gráficamente los parámetros de la forma Normal, por ser nuestro grupo de mayor interés. Para todas las formas se verá representada la Media  $\pm$  Desviación Estándar, junto al rango de distribución de cada parámetro.

No todas las representaciones de los parámetros (sean básicos o derivados) definirán por si solas las características de la forma; en la mayoría se define la forma por más de 2 rangos de los diferentes parámetros, estos serán resaltados en negrita para ser diferenciados.

### Medias y Rangos de la Forma Normal:

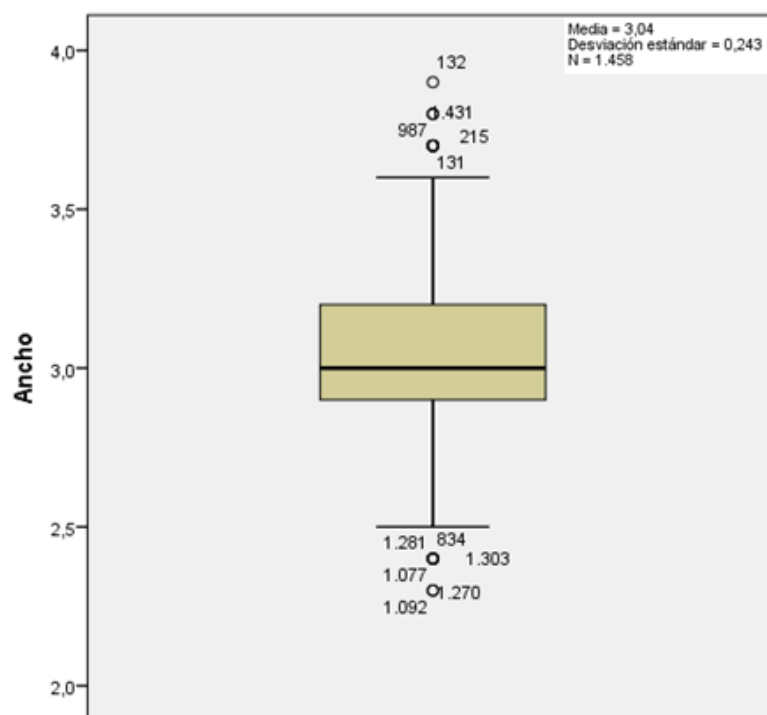


**Figura 1.** Distribución de los valores de longitud (Forma Normal).

Longitud	Media	Error estándar	Máximo	Mínimo	Desviación estándar
	5.444	0.01	6.5	4.4	0.3837

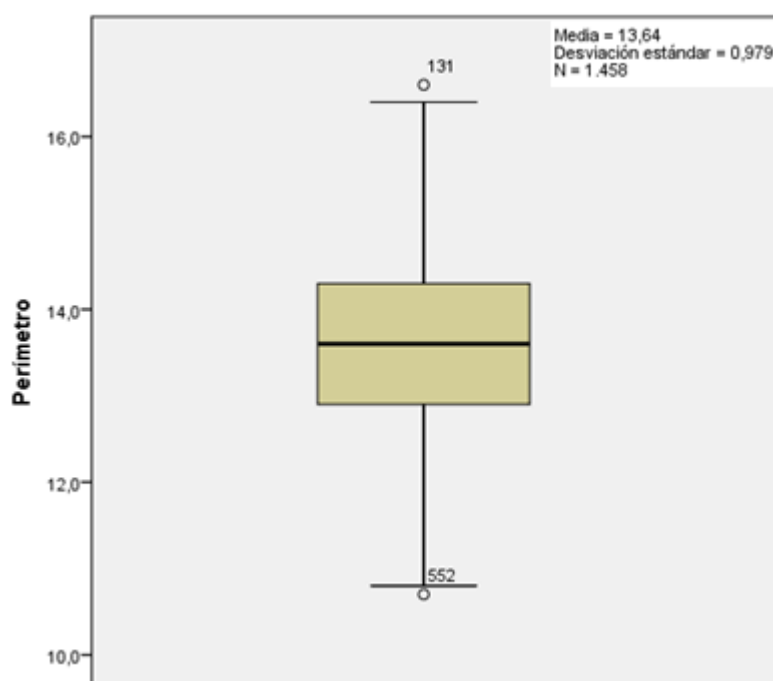
En el caso de los espermatozoides normales, la medida de longitud de cabeza es de  $5.444 \pm 0.3837 \mu\text{m}$ . Aquí vemos que el error estándar mínimo nos indica que las pruebas estadísticas presentan un resultado óptimo, debido a que el número de muestras que tiene la población es bastante alto.

Los números de las muestras representados en círculos, nos indican que ellos se encuentra fuera de la distribución normal del grupo, pero al ser un número mínimo con relación a total de muestras, no es un problema para los resultados de nuestras pruebas.



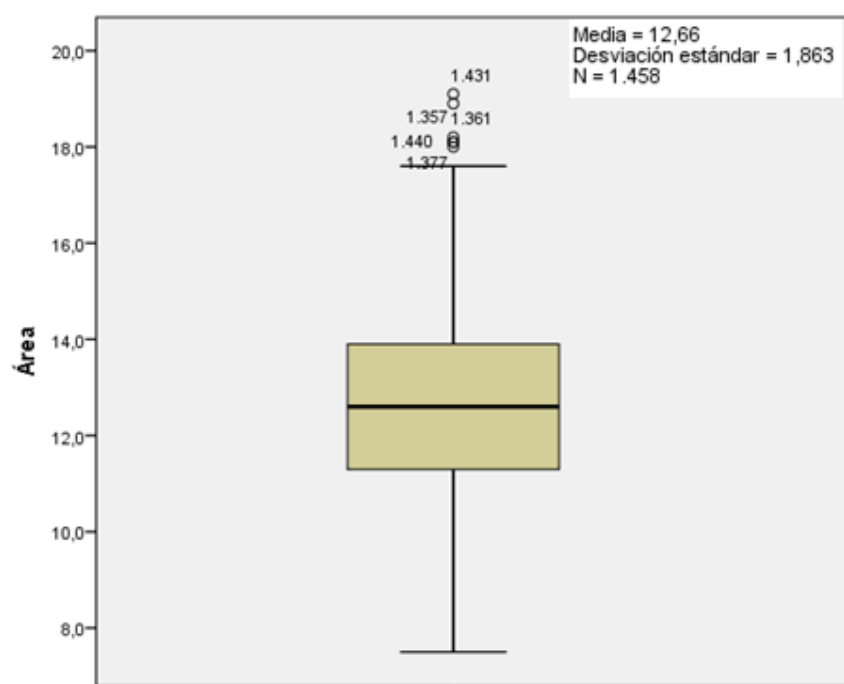
**Figura 2.** Distribución de los valores de ancho (Forma Normal).

Ancho	Media	Error estándar	Máximo	Mínimo	Desviación estándar
	3.044	0.0064	3.9	2.3	0.2428



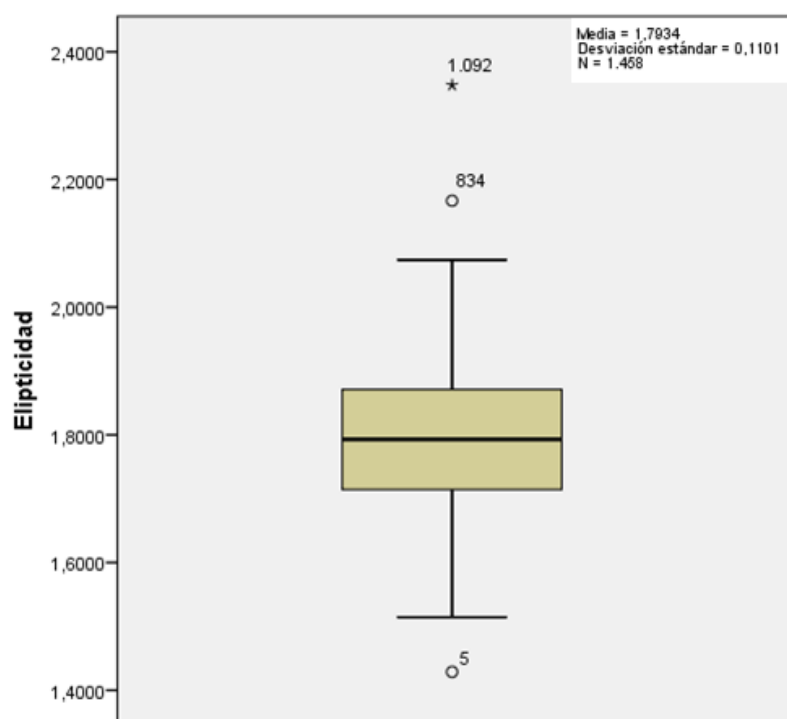
**Figura 3.** Distribución de los valores de perímetro (Forma Normal).

Perímetro	Media	Error estándar	Máximo	Mínimo	Desviación estándar
	13.64	0.0256	16.6	10.7	0.97881



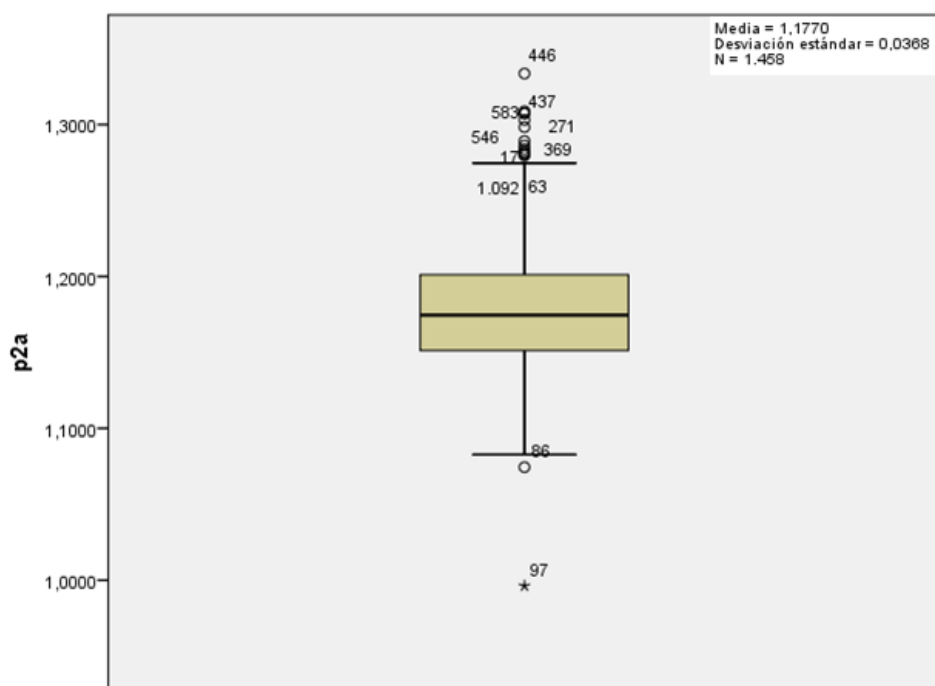
**Figura 4.** Distribución de los valores de área (Forma Normal).

Área	Media	Error estándar	Máximo	Mínimo	Desviación estándar
	12.658	0.0488	19.1	7.5	1.863



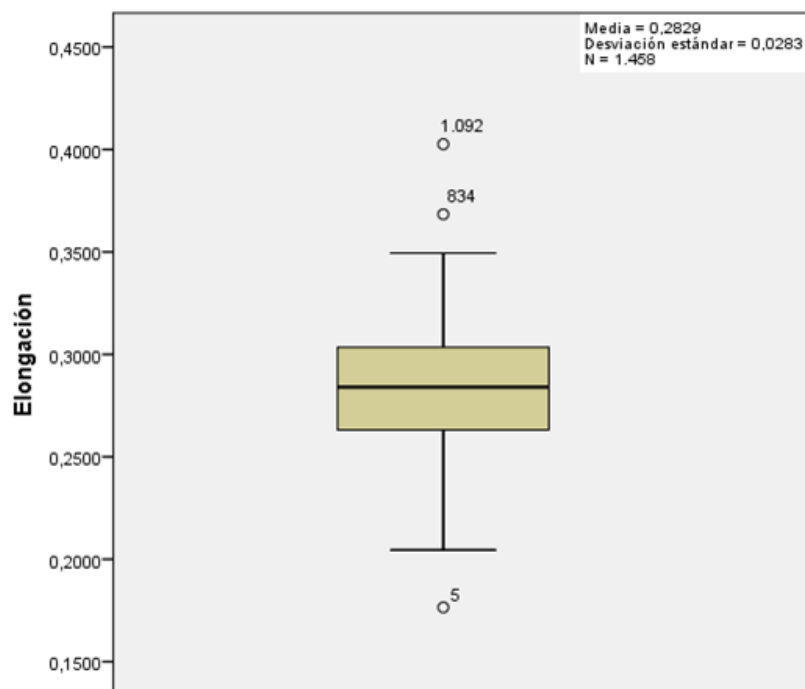
**Figura 5.** Distribución de los valores de elipticidad (Forma Normal).

Elipticidad	Media	Error estándar	Máximo	Mínimo	Desviación estándar
	1.793	0.0028	2.3478	1.4286	0.1101



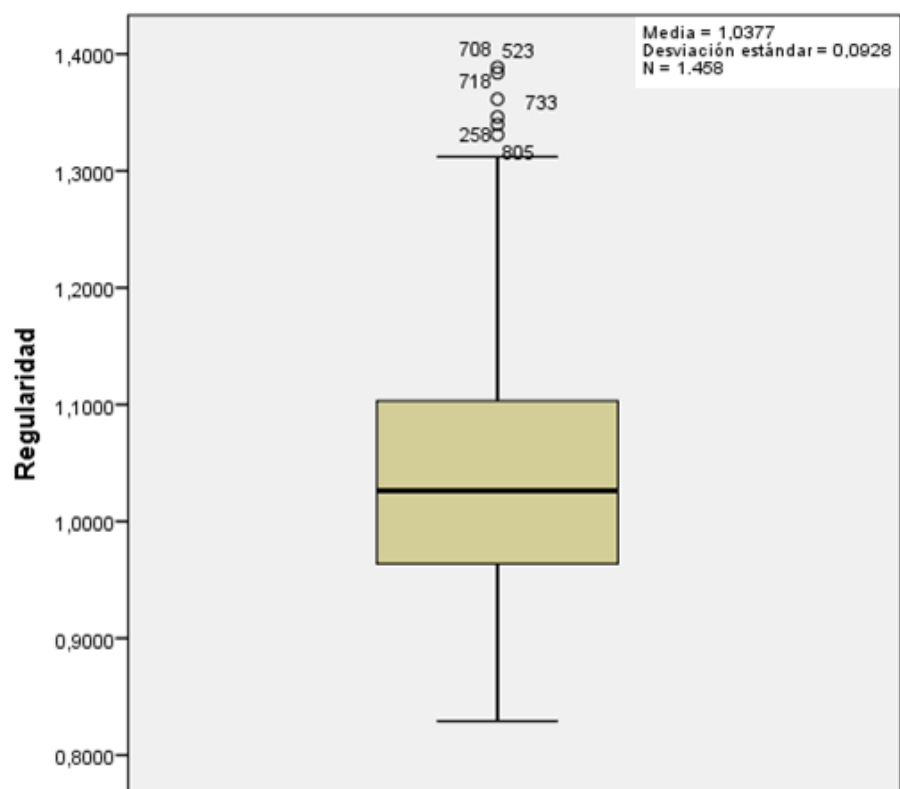
**Figura 6.** Distribución de los valores del factor forma p2a (Forma Normal).

Factor p2a	Media	Error estándar	Máximo	Mínimo	Desviación estándar
	1.177	0.0009	1.3336	0.9962	0.0367



**Figura 7.** Distribución de los valores de elongación (Forma Normal).

Elongación	Media	Error estándar	Máximo	Mínimo	Desviación estándar
	0.282	0.0007	0.4026	0.1765	0.0282



**Figura 8.** Distribución de los valores de regularidad (Forma Normal).

Regularidad	Media	Error estándar	Máximo	Mínimo	Desviación estándar
	1.037	0.0024	1.3886	0.829	0.0928

**b) Medias y Rangos según todas las formas.**

Cada una de las formas está definida por las medias y rangos de distribución de sus parámetros, siendo en casos algunos de estos determinantes para establecer que forma tienen.

**Tabla 5.** Medias, DS y rango de distribución en forma Normal.

<b>NORMAL</b>	<b>MEDIA <math>\pm</math> DS</b>	<b>RANGO</b>
Longitud ( $\mu\text{m}$ )	$5.44 \pm 0.38$	<b>4.4 - 6.5</b>
Ancho ( $\mu\text{m}$ )	$3.04 \pm 0.24$	<b>2.3 - 3.9</b>
Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	$13.64 \pm 0.97$	10.7 - 16.6
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	$12.66 \pm 1.86$	7.5 - 19.1
Elipticidad	<b><math>1.79 \pm 0.11</math></b>	1.43 - 2.35
p2a	$1.18 \pm 0.04$	0.99 - 1.33
Elongación	$0.28 \pm 0.03$	0.18 - 0.40
Regularidad	$1.04 \pm 0.09$	0.83 - 1.39
<b>n=1458</b>		

**Tabla 6.** Medias, DS y rango de distribución en forma Alargada.

<b>ALARGADA</b>	<b>MEDIA <math>\pm</math> SD</b>	<b>RANGO</b>
Longitud ( $\mu\text{m}$ )	$5.74 \pm 0.44$	<b>4.5 - 7.5</b>
Ancho ( $\mu\text{m}$ )	$2.69 \pm 0.25$	<b>2 - 3.5</b>
Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	$13.61 \pm 1.15$	10.1 - 19
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	$11.66 \pm 2.10$	6.3 - 22.9
Elipticidad	<b><math>2.14 \pm 0.14</math></b>	1.66 - 2.73
p2a	$1.28 \pm 0.05$	1.15 - 1.52
Elongación	$0.36 \pm 0.03$	0.25 - 0.46
Regularidad	$1.05 \pm 0.10$	0.85 - 1.40
<b>n=527</b>		



**Tabla 7.** Medias, DS y rango de distribución en forma Corta.

<b>CORTA</b>	<b>MEDIA <math>\pm</math> SD</b>	<b>RANGO</b>
Longitud ( $\mu\text{m}$ )	4.98 $\pm$ 0.34	<b>4.2 - 5.8</b>
Ancho ( $\mu\text{m}$ )	3.08 $\pm$ 0.29	<b>2.4 - 3.7</b>
Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	13.01 $\pm$ 1.04	10.6 - 15.4
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	11.88 $\pm$ 1.97	7.4 - 17
Elípticidad	<b>1.63 <math>\pm</math> 1.39</b>	1.32 - 2.11
p2a	1.14 $\pm$ 0.03	1.06 - 1.23
Elongación	0.24 $\pm$ 0.04	0.14 - 0.36
Regularidad	1.02 $\pm$ 0.08	0.85 - 1.24
<b>n=76</b>		

**Tabla 8.** Medias, DS y rango de distribución en forma Piriforme.

<b>PIRIFORME</b>	<b>MEDIA <math>\pm</math> SD</b>	<b>RANGO</b>
Longitud ( $\mu\text{m}$ )	5.58 $\pm$ 0.50	4.3 - 7.6
Ancho ( $\mu\text{m}$ )	2.94 $\pm$ 0.29	2.3 - 3.9
Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	13.56 $\pm$ 1.15	10.6 - 17.8
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	11.93 $\pm$ 2.03	7.2 - 19
Elípticidad	1.91 $\pm$ 0.21	1.44 - 2.58
p2a	1.24 $\pm$ 0.07	1.09 - 1.62
Elongación	0.31 $\pm$ 0.05	0.18 - 0.44
Regularidad	1.09 $\pm$ 0.09	0.90 - 1.43
<b>n=361</b>		

**Tabla 9.** Medias, DS y rango de distribución en forma Redondeada.

<b>REDONDEADA</b>	<b>MEDIA <math>\pm</math> SD</b>	<b>RANGO</b>
Longitud ( $\mu\text{m}$ )	5.07 $\pm$ 0.38	<b>3.7 - 6.2</b>
Ancho ( $\mu\text{m}$ )	3.32 $\pm$ 0.24	<b>2.7 - 4.1</b>
Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	13.23 $\pm$ 1.03	10.2 - 16.6
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	12.65 $\pm$ 2.00	7.0 - 19.7
Elípticidad	<b>1.53 <math>\pm</math> 0.09</b>	1.19 - 1.9
p2a	1.11 $\pm$ 0.03	1.02 - 1.26
Elongación	0.21 $\pm$ 0.03	0.09 - 0.31
Regularidad	1.06 $\pm$ 0.09	0.86 - 1.33
<b>n=263</b>		

**Tabla 10.** Medias, DS y rango de distribución en forma Macrocéfala.

<b>MACROCEFALIA</b>	<b>MEDIA <math>\pm</math> SD</b>	<b>RANGO</b>
Longitud ( $\mu\text{m}$ )	$6.57 \pm 0.34$	<b>6.0 - 8.8</b>
Ancho ( $\mu\text{m}$ )	$3.15 \pm 0.44$	<b>2.3 - 4.8</b>
Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	$15.81 \pm 1.12$	13.2 - 21.6
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	$15.82 \pm 3.02$	9.7 - 30.7
Elipticidad	$2.12 \pm 0.27$	1.57 - 2.84
p2a	$1.27 \pm 0.09$	1.07 - 1.56
Elongación	$0.35 \pm 0.06$	0.22 - 0.48
Regularidad	$1.04 \pm 0.09$	0.83 - 1.29
<b>n=195</b>		

**Tabla 11.** Medias, DS y rango de distribución en forma Microcéfala.

<b>MICROCEFALIA</b>	<b>MEDIA <math>\pm</math> SD</b>	<b>RANGO</b>
Longitud ( $\mu\text{m}$ )	$4.33 \pm 0.28$	<b>3.4 - 5.2</b>
Ancho ( $\mu\text{m}$ )	$2.69 \pm 0.38$	<b>1.9 - 3.7</b>
Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	$11.20 \pm 0.90$	8.5 - 13.3
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	$8.80 \pm 1.67$	4.8 - 12.8
Elipticidad	$1.65 \pm 0.26$	1.19 - 2.42
p2a	$1.15 \pm 0.08$	1.04 - 1.39
Elongación	$0.24 \pm 0.07$	0.08 - 0.41
Regularidad	$1.05 \pm 0.12$	0.86 - 1.37
<b>n=120</b>		

### 5.3. PRUEBAS ESTADÍSTICAS CUALITATIVAS

#### **a) En Cabeza.**

Tomando en cuenta el Manual de Laboratorio de la OMS (2010) y el Criterio estricto de Tygerberg (Kruger *et al.*, 1986; 1987). Se elaboró la Tabla 12, tipificando como anormal al número total de cabezas espermáticas de la Tabla 3, excluyendo a las que poseía cabeza con forma Normal.

**Tabla 12.** Porcentajes totales de defectos en cabeza espermática.

LAMINA	Defectos en cabeza (%)
1	56.5
2	54.5
3	53.5
4	49.5
5	53
6	53
7	48.5
8	54
9	56.5
10	46
11	51.5
12	51
13	47
14	48.5
15	48

**b) En Pieza Media y Cola Espermática.**

En la Tabla 13, se representan numérica y porcentualmente los defectos de pieza media y cola, se contaron en conjunto espermatozoides completos e incompletos (carentes de cola) hasta llegar a la cantidad requerida de 200 completos.

Los espermatozoides completos fueron agrupados porcentualmente según: Defectos en cola (dentro del cual se separaron el número de enrollamientos y el acortamiento de la cola), defectos en la pieza media (por inserción asimétrica a la cabeza o irregularidad en su forma) y como Normales al haber ausencia de cualquier defecto mencionado (Tabla 14).

**Tabla 13.** Frecuencias de espermatozoides completos.

N° de Lámina	N° Total de esperm.	N° de esperm. carentes de cola	Esperm. completos (%)
1	238	38	84.03 %
2	295	95	67.79 %
3	282	82	93 %
4	206	6	97.08 %
5	230	30	86.95 %
6	218	18	91.74 %
7	238	38	84.03 %
8	261	61	76.62 %
9	216	16	92.59 %
10	209	9	95.69 %
11	224	24	89.28 %
12	218	18	91.74 %
13	207	7	96.61 %
14	229	29	87.33 %
15	223	23	89.68%

**Tabla 14.** Número total de espermatozoides, según sus defectos en cola y pieza media.

n° de lámina	TOTAL DE ESPERMATOZOIDES ( n = 200 / lámina )					
	Cola				Región media	Normal
	Corta	Enrollamiento (n° de loops)			Doblamiento	
		1	2	3		
1	10	10	-	-	4	186
2	8	95	-	2	19	76
3	-	10	-	-	4	186
4	6	12	-	-	4	178
5	3	3	-	-	-	194
6	10	1	-	-	3	186
7	3	17	3	-	12	165
8	5	17	-	-	5	173
9	4	7	1	-	14	174
10	3	39	7	-	9	142
11	2	10	3	-	7	178
12	-	12	3	-	12	173
13	3	12	1	-	13	171
14	9	5	7	-	5	174
15	2	33	14	-	9	142

**Tabla 15.** Porcentaje total de espermatozoides, según sus defectos en cola y pieza media.

<b>PORCENTAJES DEL TOTAL DE ESPERMATOZOIDES</b>			
<b>n° de lámina</b>	<b>Defectos en cola (%)</b>	<b>Defectos en pieza media (%)</b>	<b>Espermat. normales</b>
<b>1</b>	10 %	2%	88 %
<b>2</b>	52.5 %	9.5 %	38 %
<b>3</b>	5 %	2 %	93 %
<b>4</b>	9 %	2 %	89 %
<b>5</b>	3 %	-	97 %
<b>6</b>	5.5 %	1.5 %	93 %
<b>7</b>	11.5 %	6 %	82.5 %
<b>8</b>	11 %	2.5 %	86.5 %
<b>9</b>	6 %	7 %	87 %
<b>10</b>	24.5 %	4.5 %	71 %
<b>11</b>	7.5 %	3.5 %	89 %
<b>12</b>	7.5 %	6 %	86.5 %
<b>13</b>	8 %	6.5 %	85.5 %
<b>14</b>	10.5 %	2.5 %	87 %
<b>15</b>	24.5 %	4.5 %	71 %

## 5.4. RESULTADOS FINALES DE ANORMALIDADES

La siguiente tabla presenta como resultados los porcentajes de defectos en las cabezas espermáticas y en la pieza media y cola, presentándose estos dos últimos juntos, haciendo de esta manera un compilado los resultados obtenidos anteriormente. Las celdas de anomalías totales implican la suma de las dos celdas anteriores que incluyen las tres principales estructuras del espermatozoide, es decir, el porcentaje total de espermatozoides considerados anormales en cuanto al total de su morfología, que a su vez puede ser comparada con los resultados de porcentaje de anomalías iniciales obtenida en la evaluación preliminar de los eyaculados.

**Tabla 16.** Frecuencias finales de defectos según las formas.

LAMINA	Nombre y/o n° de individuo	Defectos en cabeza (%)	Defectos en Pieza Media y cola (%)	Porcentaje de anomalías preliminares (%)
1	17	56.5	12	28
2	16	54.5	62	/
3	2	53.5	7	/
4	6	49.5	11	/
5	Legolas	53	3	19
6	17	53	7	24
7	3	48.5	17.5	29
8	17	54	13.5	/
9	2	56.5	13	16
10	16	46	29	22
11	6	51.5	11	18
12	9	51	13.5	21
13	Legolas	47	14.5	-
14	17	48.5	13	-
15	3	48	29	-

## VI.- DISCUSIÓN

### **Colecta de semen en alpacas.**

De los 10 machos que componían nuestra población de alpacas, solo fue posible efectuar colectas a 7 de ellos, de los cuales se obtuvo un total de 15 eyaculados, siendo en la mayoría de casos de 2 colectas por individuo (Tabla 1). La colecta se efectuó mediante el uso de vagina artificial, que según diversos autores (Sumar, 1991; Lichtenwalner *et al.*, 1996; Bravo *et al.*, 2000; Alarcón *et al.*, 2012) es el mejor método de colección de semen para esta especie de camélido doméstico.

Se debe tomar en cuenta que no se logró colectar semen de todos los individuos debido a comportamientos específicos como: presentarse involuntarios para efectuar la colecta, no mostrar atracción hacia las hembras o no sentirse cómodos con la vagina artificial, a pesar de haber sido entrenado para la colecta con hembra receptiva o maniquí como mencionan Dávalos & Olazábal (2002). Mientras que en otros casos solo pudo obtenerse plasma seminal de las colectas ,innecesario para la investigación; además de algunas limitaciones en el manejo de la muestra por la gran viscosidad del semen (Giuliano, 2012).

Inmediatamente después de colectado, se efectuaron las evaluaciones espermáticas preliminares, con el objetivo de contrastar estos resultados con los parámetros morfológicos se que obtuvieron al final del presente trabajo y fueron más específicos.

### **Formas de cabeza espermática.**

Las formas de cabeza espermática propuestas por Buendía *et al.* (2002): Normal, alargada, corta, piriforme y redondeada, no son suficientes para delimitar los tipos de cabeza que se pueden presentar en espermatozoides de alpaca; ya que formas especiales como cabezas con macrocefalia y microcefalia no necesariamente se ajustan a los límites establecidos para las formas generales.



Los estudios de morfometría espermática en mamíferos, en su mayoría se desarrollaron mediante el uso del sistema CASA, que mediante la citometría de flujo, permite estudiar las características morfológicas de los espermatozoides, aunque por ser un sistema automático necesita de una exacta calibración, además de ser altamente costosa (Verstegen *et al.*, 2002). Ha sido comúnmente empleado en investigaciones de equinos (Ball & Mohammed, 1995; Casey *et al.*, 1997), porcinos (González Villalobos *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2012), ovinos (Sancho *et al.*, 1998; Bravo Delgado, 2010; Castillo Lalaguna, 2012; Maroto, 2012), caprinos (Hidalgo Prieto, 2004), bovinos (Gravance, 1996), caninos (Jurado, 2008), en Macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*) (Gago *et al.*, 1998) y en humanos (Pérez-Sánchez *et al.*, 1994; Auger, 2010), demostrando la importancia del uso de sistemas computarizados automáticos. Pero por ser un sistema automático, siempre se va a ver sujeto a un margen de error a pesar de una buena calibración, a comparación de la toma de datos manuales, que reduce al mínimo este margen, en especial si cada medida es efectuada por un mismo investigador que haya sido previamente entrenado. El manejo de un programa vectorial (Quick Photo MICRO 3.0, en el presente trabajo), nos permite efectuar mediciones de estructuras microscópicas en unidades especiales como los micrómetros, que trabaja mediante el trazado de líneas o la formación de figuras geométricas regulares.

Cada forma de cabeza espermática, fue caracterizada según los parámetros básicos empleados por Buendía *et al.* (2002): longitud, ancho, área y perímetro; aunque para ser óptimamente caracterizada cada forma, se precisó de otros parámetros derivados propuestos por otros autores (Pérez-Sánchez *et al.*, 1994; Casaretto, Lombardo *et al.*, 2012; Valle *et al.*, 2013), que se obtienen a partir de los básicos mediante fórmulas matemáticas: Elipticidad, factor forma  $p2a$ , elongación y regularidad; con la finalidad de obtener una delimitación numérica más precisa para cada forma.

Otro factor que disminuye el margen de error en la toma de datos morfométricos, es el uso de una óptima técnica de tinción, como es la tinción Papanicolau (OMS, 2010), por otro lado Aksoy *et al.* (2012) en su estudio de morfología en espermatozoides humanos, donde empleó diferentes métodos de tinción, describe que tanto la tinción Papanicolau como la hematoxilina eosina (HE) son técnicas válidas para los estudios de morfología espermática, razón por la cual en el presente trabajo, se usó la técnica de tinción Papanicolau modificada por nosotros para espermatozoides fijados, por permitir diferenciar claramente estructuras internas como el acrosoma. Entonces, mediante el uso de esta tinción se obtuvieron resultados que brindaron información detallada acerca de la morfología e integridad de la célula espermática, que permitió resaltar notoriamente todo el perímetro de la célula, optimizando los resultados obtenidos en los análisis morfométricos manuales.

#### **Anormalidades en estructuras espermáticas.**

Además de presentar anomalías naturales, es posible que el método de fijación empleado en el presente trabajo, haya influido en la pérdida o acortamiento de ciertas estructuras, como en el caso de las cabezas con ausencia de pieza media y cola; por eso, en los antecedentes de estudios de morfometría espermática, solo se observan análisis de cabeza, excluyendo las otras estructuras (Pérez Sánchez *et al.*, 1994; Buendía *et al.*, 2002; Valle *et al.*, 2013). A pesar de eso, se efectuó un conteo de las cabezas independientes, pero no se tomaron en cuenta para las pruebas estadísticas de anomalías morfológicas, por no haberse encontrado esta característica en la evaluación preliminar luego de la colección y previo a la fijación.

#### **Pruebas estadísticas.**

Se debe tomar en cuenta la contracción que pueden inducir la fijación y la tinción. Como menciona el artículo de Aksoy *et al.* (2012), habrá alguna diferencia en las

mediciones según cada tipo de tinción empleado, siendo la tinción Papanicolau una de las recomendadas para los análisis morfométricos de espermatozoides. Según los resultados obtenidos se observó que hay una mayor relevancia de los parámetros derivados para caracterizar las formas de cabezas espermáticas, por describir numéricamente la elipticidad, elongación, entre otros.

A diferencia de la metodología empleada por Buendía *et al.* (2002), este trabajo se ha delimitado morfométricamente cada uno de sus parámetros básicos y derivados, por lo que se propone que algunas de estas valoraciones numéricas sean empleadas como patrones cuantitativos y sean complementarios para la identificación de las formas de las cabezas, ya que siempre han sido delimitadas comparativamente.

Para las pruebas estadísticas cualitativas, nos basamos en los criterios de calidad espermática establecidos por el Manual de Laboratorio de la OMS (2010) y el Criterio estricto de Tygerberg (Kruger *et al.*, 1986; 1987), que mediante una serie de condiciones morfológicas determinan la normalidad en cada una de las principales estructuras de espermatozoide: Cabeza, pieza media y cola. Por ser cualitativas, serán delimitados como normales o anormales, y serán representados porcentualmente. Entre las anomalías establecidas por lo mencionados criterios, también se toman en cuenta las regiones vacuolares y el área acrosomal, siendo por esto importante la tinción Papanicolau, ya que es una técnica que permite realzar notoriamente las estructuras deseadas y permitió evaluar defectos morfométricos en el espermatozoide de alpaca.

No se desarrollaron pruebas cuantitativas para las colas espermáticas como en el caso de las cabezas, porque estas se ven comúnmente afectadas por los procesos de fijación y centrifugación, viéndose seriamente afectadas en su mayoría con la fragmentación de parte de su estructura.

Si queremos referirnos a fertilidad, los porcentajes de normalidad en cada eyaculado según la morfología no son tan bajos como para ser considerados estos individuos como infértiles, ya que actualmente, el rango porcentual de espermatozoides normales en humanos se ha descrito que posean el 4 % según el valor predictivo del criterio estricto de Tygerberg (Lindheim *et al.*, 1996; Montanaro-Gauci *et al.*, 2001; Van Waart *et al.*, 2001). En este trabajo el porcentaje de formas normales de la población analizada de alpacas fértiles asciende al 43.5% en el en caso de cabeza y en el 38% para pieza media y cola, entonces el límite de fertilidad para el presente grupo de estudio es del 38%.

Por último, en la Tabla 16 tenemos los defectos porcentuales en cabeza, pieza media y cola, y haciendo una comparación con los resultados preliminares, los resultados porcentuales de anomalías son mucho mayores cuando se hace un estudio más detallado. Si comparamos los resultados obtenidos entre las diferentes colectas de un mismo macho, observamos que no presentan diferencias significativas; con excepción del macho 17, que a diferencia del resto, presentan excesivos enrollamientos de cola, lo que también se describe para el espermatozoides humano como colas enrolladas (OMS, 2010).

La investigación de Buendía *et al.* (2002), es nuestra principal referencia de estudios morfométricos en cabeza espermática de alpaca, que a diferencia del presente trabajo, desarrolló sus estudios en machos de quienes no se tenía conocimiento que fueran de fertilidad comprobada o no. Trabajaron los parámetros en general a partir del total de espermatozoides sea cual sea su forma, así como con los porcentajes totales según su tamaño y formas generales; en la presente tesis, trabajamos los parámetros básicos y derivados de acuerdo a la forma de la cabeza espermática, y los porcentajes totales se dieron según las misma formas propuestas por Buendía, además de las cabeza con macrocefalia y microcefalia, evitando de esta manera separarlos según tamaño y formas generales.

## VII. CONCLUSIONES

- Las subpoblaciones de las cabezas espermáticas pueden ser identificadas y clasificadas, tanto cualitativa como cuantitativamente, por tener rangos en sus parámetros, de formas básicas y derivadas, que los diferencian a unos de otros y los hace diagnosticables.
- Existe una relación entre la fertilidad comprobada del macho y la morfometría espermática, observándose como valor límite de fertilidad de 43.5% para la cabeza y de 38% para la pieza media y cola, para la población en estudio.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aksoy, E., T. Murad, S. Duman, y C. Gokhan. 2012. «Assessment of Spermatozoa Morphology under Light Microscopy with Different Histologic Stains and Comparison of Morphometric Measurements». *Int. J. Morphol.* 30 (4): 1544-50.

Alarcón B., V., W. García V., y W. Bravo P. 2012. «Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial». *Rev. Inv. Vet. Perú* 23 (1): 58-64.

Auger, Jacques. 2010. «Assessing human sperm morphology: top models, underdogs or biometrics?» *Asian Journal of Andrology* 12: 36-46.

Ball, B.A., y H.O. Mohammed. 1995. «Morphometry of stallion spermatozoa by computer-assisted image analysis». *Theriogenology* 44: 367-377.

Banda R., J., S. Evangelista V., L. Ruiz G., R. Sandoval M., C. Rodríguez LI., M. Valdivia C., y A. Santiani A. 2010. «Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y Leche Descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca». *Rev Inv Vet Perú* 21 (2): 145-53.

Bourke, D.A., C.E. Kyle, T.G. McEvoy, P. Young, y C.L. Adams. 1995. «Advanced reproductive technologies in South American Camelids». En *Proceedings of the 2nd European Symposium on South American Camelids*, pp. 235-243. Publ Universita degli Studi di Camerino: Gerken, M., Renieri, C. (Eds.).

Bravo Delgado, Juan Andrés. 2010. «Estudio de la influencia de la estación sobre los parámetros seminales y morfométricos del espermatozoide de morueco de raza Ile de

France». Tesis doctoral, Cáceres: Universidad de Extremadura.

Bravo, P., U. Flores, J. Garnica, y C. Ordoñez. 1997. «Collection of semen and artificial insemination of alpacas». *Theriogenology* 47: 619-626.

Bravo, P.W., J.A. Skidmore, y X.X. Zhao. 2000. «Reproductive aspects and storage of semen in camelidae». *Animal Reproduction Science* 62: 173-193.

Buendía, P., C. Soler, F. Paolicchi, G. Gago, B. Urquieta, F. Pérez-Sánchez, y E. Bustos-Obregón. 2002. «Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm-Class Analyzer computer-assited system». *Theriogenology* 57: 1207-1218.

Casaretto, C., D.M. Lombardo, S. Giuliano, M. Gambarotta, M.I. Carretero, y M.H. Miragaya. 2012. «Morphometric analysis of llama (*Lama glama*) sperm head». *Andrologia* 44: 424-30.

Casaretto, C., M. Martínez Sarrasague, S. Giuliano, E. Rubin de Celis, M. Gambarotta, I. Carretero, y M. Miragaya. 2012. «Evaluation of Lama glama semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer». *Andrologia* 44: 335-41.

Casey, P.J., C.G. Gravance, R.O. Davis, D.D. Chabot, y I.K.M. Liu. 1997. «Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions». *Theriogenology* 47: 575-582.

Castillo Lalaguna, Virginia. 2012. «Desarrollo de un método de referencia basado en el método isa y análisis de imágenes para la evaluación morfométrica del acrosoma del espermatozoide en la especie ovina». Tesis Licenciatura, Zaragoza: Escuela

politécnica superior de Huesca. Universidad de Zaragoza.

Dávalos R., Rosa, y Juan Olazábal L. 2002. «Evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas». *Rev Inv Vet Perú* 13 (2): 98-99.

De Lamo, Daniel. 2011. *Camélidos sudamericanos. Historia, usos y sanidad animal*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Servicio Nacional de Sanidad y calidad agroalimentaria. SENASA.

Director, A., S. Giuliano, y M. Miragaya. 2004. «Evaluation of llama (*Lama glama*) semen obtained by electroejaculation or using an artificial vagina». *Proceedings of 15th International Congress on Animal Reproduction (ICAR)*: p. 216.

Gago, C., F. Pérez-Sánchez, C.H. Yeung, L. Tablado, T.G. Cooper, y C. Soler. 1998. «Standardization of sampling and staining methods for the morphometric evaluation of sperm heads in the *Cynomolgus* monkey (*Macaca fascicularis*) using computer-assisted image analysis». *International journal of andrology* 21: 169-176.

Gauthier-Pilthers, H., y A.I. Dagg. 1981. *The Camel: its evolution, ecology, behavior, and relationship to man*. USA: University of Chicago Press.

Giuliano, S., A. Director, M. Gambarotta, V. Trasorras, y M. Miragaya. 2008. «Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*)». *Animal Reproduction Science* 104: 359-69.

Giuliano, S.M. 2012. «Extracción y evaluación de semen de camélidos sudamericanos». *Spermova* 2 (1): 6-9.



González Villalobos, D., A. Quintero-Moreno, J.J. López-Brea, M.C. Estes, M.R. Fernández-Santos, J. Rubio-Guillén, W. Mejía Silva, Y. González Marval, G. León Atencio, y R. Bohórquez Corona. 2008. «Caracterización morfométrica de la cabeza del espermatozoide porcino mediante análisis computarizado». *Revista Científica, FCV-LUZ* XVIII (5): 570-577.

Gravance, C.G., R. Vishwanath, C. Pitt, y P.J. Casey. 1996. «Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads». *Theriogenology* 46: 1205-1215.

Guraya, S.S. 1987. *Biology of spermatozoa and spermatogenesis in mammals*. Berlin: Springer-Verlag.

Hidalgo Prieto, Manuel. 2004. «Estudio del efecto de la congelación-descongelación sobre los parámetros morfométricos del espermatozoide de macho cabrío». Tesis Doctoral, Córdoba: Universidad de Córdoba.

INEI. 2012. «IV Censo Nacional Agropecuario». Sistema de consulta de resultados censales. Perú: Instituto Nacional de Estadística e Informática.

Jurado, S., P. Sarmiento, y A. Stornelli. 2008. «La microscopía electrónica como herramienta en la evaluación de semen canino». *Analecta Veterinaria* 28 (1): 7-14.

Kadwell, M, M Fernandez, H F Stanley, R Baldi, J C Wheeler, R Rosadio, y M W Bruford. 2001. «Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca.» *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 268 (1485): 2575-2584.

Kruger, T.F., A.A. Acosta, K.F. Simmons, R.J. Swanson, J.F. Matta, L.L. Veeck, M. Morshedi, y S. Brugo. 1987. «New method of evaluating sperm morphology with

predictive value for human in vitro fertilization». *Urology* 30 (3): 248-51.

Kruger, T.F., R. Menkveld, F.S. Stander, C.J. Lombard, J.P. Van der Merwe, J.A. van Zyl, y K. Smith. 1986. «Sperm morphologic features as a prognostic factor in in-vitro fertilization». *Fertil Steril* 46 (6): 1118-23.

Lichtenwalner, A.B., G.L. Woods, y J.A. Weber. 1996. «Seminal collection, seminal characteristics and pattern of ejaculation in llamas». *Theriogenology* 46: 293-305.

Lindheim, S.R., D.H. Barad, M. Zinger, B. Witt, H. Amin, B. Cohen, H. Fisch, y P. Barg. 1996. «Abnormal Sperm Morphology Is Highly Predictive of Pregnancy Outcome During Controlled Ovarian Hyperstimulation and Intrauterine Insemination». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 13 (7): 569-72.

Marín, J.C., B. Zapata, B.A. González, C. Bonacic, J.C. Wheeler, C. Casey, M.W. Bruford, R.E. Palma, E. Poulin, M.A. Alliende y A.E. Spotorno. 2007. «Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular». *Revista Chilena de Historia Natural* 80: 121-140.

Maroto Morales, Alejandro. 2012. «Evaluación objetiva de la morfometría de los espermatozoides de ovino (*Ovis aries*). Relaciones con la fertilidad.» Tesis Doctoral, Albacete: Universidad De Castilla - La Mancha.

Mann, T., y C. Lutwak-Mann. 1981. «Male reproductive function and semen». En *Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology*, 495. Berlin, Germany: Springer-Verlag.

McEvoy, T.G., C.E. Kyle, D. Slater, C.L. Adams, y D.A. Bourke. 1992. «Collection,

evaluation and cryopreservation of llama semen». *Journal of Reproduction and Fertility* 9 (81): 48.

Menkveld, R., F.S. Stander, T.J. Kotze, T.F. Kruger, y J.A. van Zyl. 1990. «The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria». *Human Reproduction* 5 (5): 586-92.

Montanaro Gauci, M., T.F. Kruger, K. Coetzee, K. Smith, P. van der Merwe, y C.J. Lombard. 2001. «Stepwise regression analysis to study male and female factors impacting on pregnancy rate in an intrauterine insemination programme». *Andrologia* 33: 135-41.

Morales, B., A. Quintero-Moreno, C. Osorio-Meléndez, y J. Rubio-Guillén. 2012. «Valoración de la biometría de la cabeza del espermatozoide mediante análisis computarizado en semen de cerdo recién colectado y refrigerado». *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 29: 413-431.

Pérez-Sánchez, F., J.J. Monserrat, y C. Soler. 1994. «Morphometric analysis of human sperm morphology». *International journal of andrology* 17 (248-255).

Nowak, R. M. 1991. *Guanaco, Llama and Alpaca. Walker's Mammals of the World*. 5th edition. Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press.

Sancho, M., F. Pérez-Sánchez, L. Tablado, J.J. Monserrat, y C. Soler. 1998. «Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: Evaluation of different fixative techniques». *Theriogenology* 50: 27-37.

San Martín, F.A. 1991. «Alimentación y Nutrición. Capítulo VII (213-262)». En *Avances*

*y perspectivas del conocimiento de los Camélidos sudamericanos*, 429 pp. Santiago, Chile: FAO.

*SPSS for Windows* (versión 22). 2014. Windows. IBM.

Sumar, J., y C. Leyva. 1981. «Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*Lama pacos*)». IV convención internacional sobre camélidos sudamericanos. En Punta Arenas-Chile.

Sumar, J. 1991. «Fisiología de la reproducción del macho y manejo reproductivo». En *Avances y perspectivas del conocimiento de los Camélidos sudamericanos*, pp. 111-147. FAO, Santiago, Chile: Fernández-Baca, S- (Ed.).

Valcarcel Ascencios, S.P. 2011. «Sistema inteligente para calificar alpacas en función a su fibra fina». Tesis de Maestría, Lima - Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Valle, R.R., P.R. Arakaki, F.M. Carvalho, J.A.P.C. Muniz, C.L.V. Leal, y M. García-Herreros. 2013. «Identification of sperm head subpopulations with defined pleiomorphic characteristics in ejaculates of captive Goeldi's monkeys (*Callimico goeldii*)». *Animal Reproduction Science* 137: 94-102.

Van Waart, J., T.F. Kruger, C.J. Lombard, y W. Ombelet. 2001. «Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review». *Human Reproduction Update* 7 (5): 495-500.

Verstegen, J., M. Iguer-Ouada, y K. Onclin. 2002. «Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice». *Theriogenology* 57: 149-179.

Watson, P. F. 1978. «A review of techniques of semen collection in mammals». *Symposium of the Zoological Society of London* 43: 97-126.

Wheeler, J.C. 1984. «On the origin and early development of camelid pastoralism in the Andes». *Clutton-Brock J & C Grigson (eds) Animals and archaeology* Volume 3: Early herders and their flocks. British Archaeological Reports, BAR International Series 202, Oxford, United Kingdom: 395-410.

Wheeler, J.C. 1991. «Origen, evolución y status actual». En *Avances y perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos*, 429. Santiago, Chile: FAO.

Wheeler, J C. 1995. «Evolution and present situation of the South American Camelidae». *Biological Journal of the Linnean Society* 54: 271-295.

Wheeler, J.C. 2000. «Patrones prehistóricos de utilización de los camélidos sudamericanos». *Boletín de Arqueología PUCP (Perú)* 3: 297-306.

Wheeler, J.C. 2005. «El debate sobre el origen de la alpaca». *Revista de la Academia Peruana de Ciencias Veterinarias* 5-6: 40-46.

WHO (World Health Organization). 2010. *WHO Laboratory Manual for Examination and Processing of Human Semen*. Fifth Edition.

Watson, P. F. 1978. «A review of techniques of semen collection in mammals». *Symposium of the Zoological Society of London* 43: 97-126.

## X. ANEXOS

**Tabla 17.** Secuencia de inmersiones de semen fijado para la preparación de láminas en tinción Papanicolau.

TINCIÓN PAPANICOLAU PARA ESPERMATOZOIDES DE ALPACA FIJADOS		
1	Sumergir láminas en etanol al 95% (v/v)	25 minutos
2	Etanol 80% (v/v)	1 minuto
3	Etanol 50% (v/v)	1 minuto
4	Agua destilada	1 minuto
5	Hematoxilina de Harris	15 minutos
6	Agua destilada	1 minuto
7	Etanol ácido	16 inmersiones *
8	Chorro de agua corriente	7 minutos
9	Etanol 50% (v/v)	1 minuto
10	Etanol 80% (v/v)	1 minuto
11	Etanol 95% (v/v)	25 minutos
12	Tinción Orange G-6	10 minutos
13	Etanol 95% (v/v)	1 minuto
14	Etanol 95% (v/v)	1 minuto
15	Etanol 95% (v/v)	1 minuto
16	Tinción Green EA-50	8 minutos
17	Etanol 95% (v/v)	1 minuto
18	Etanol 95% (v/v)	1 minuto
19	Etanol 100%	1 minuto
20	Etanol 100%	1 minuto
21	Xilol: Alcohol	1 minuto
22	Xilol	1 minuto
23	Una gota de Bálsamo de Cánada y de Xilol para montar la lámina.	

\* El tiempo de inmersión es de 1 segundo.

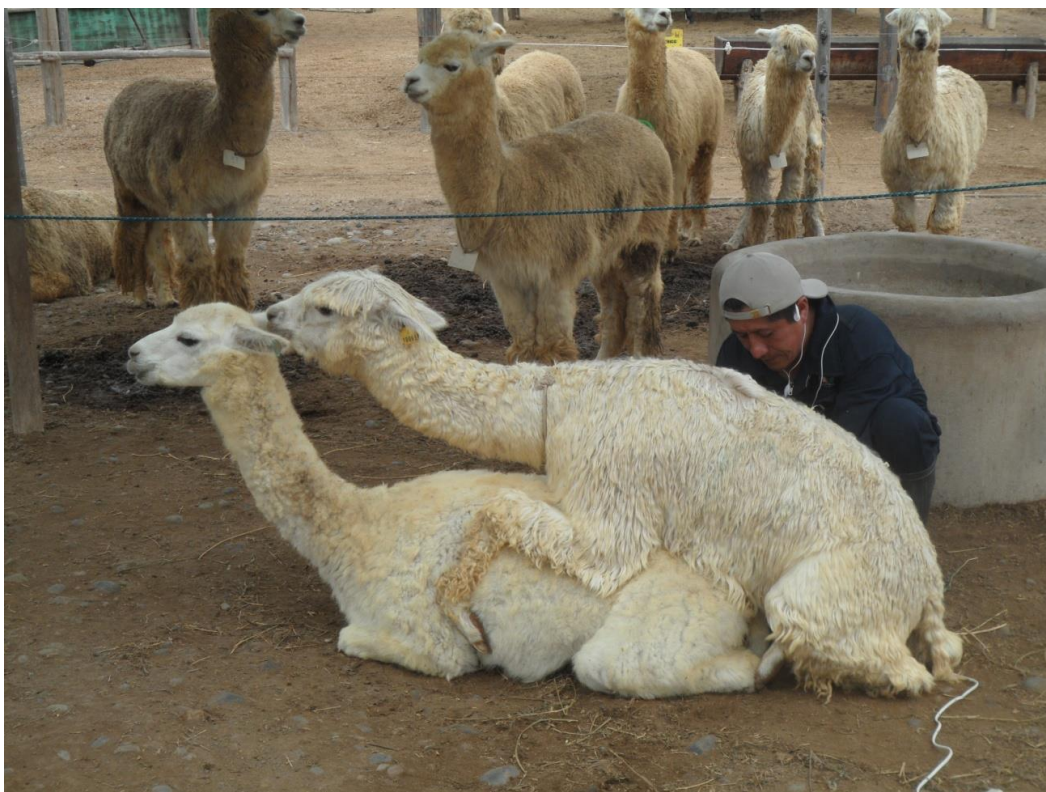
**Tabla 18.** Preparación de PBS 10X

Compuesto	Peso Molecular	mM	Preparación	
			Para 50 mL	Para 100 mL
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	142	7.2	0.512 g.	1.024 g.
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	120	2.8	0.168 g.	0.336 g.
NaCl	58.5	150	4.387 g.	8.775 g.
Agua Destilada	-	-	50 mL	100 mL

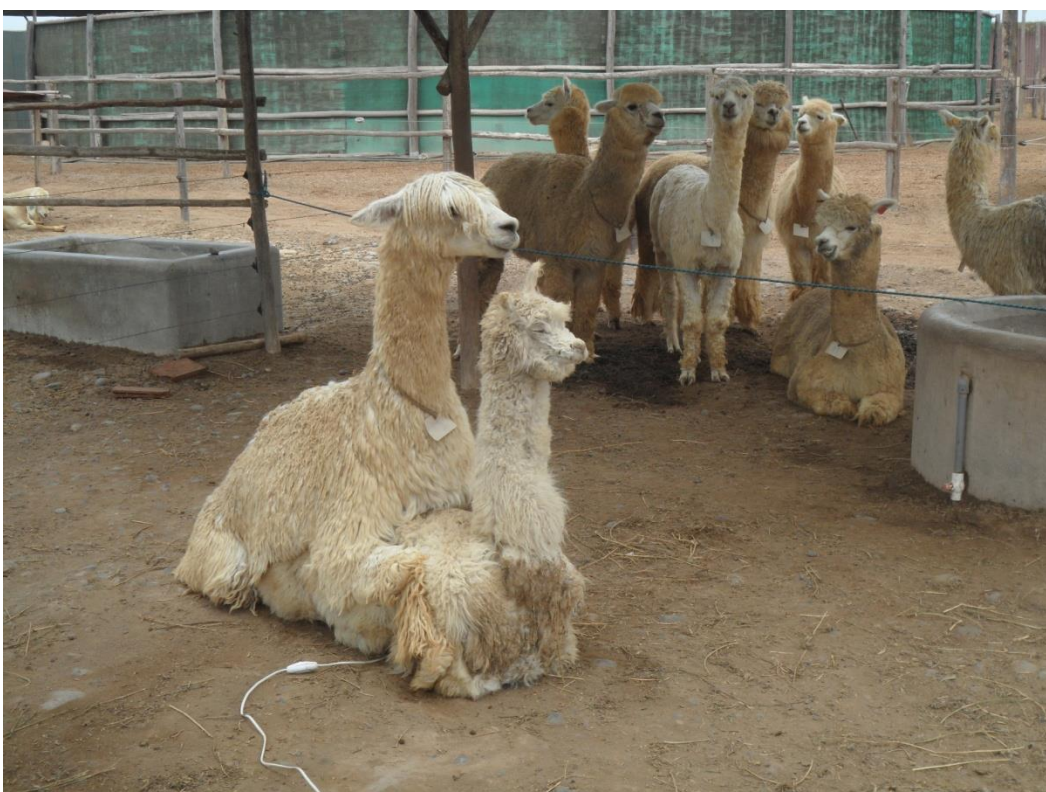


**Figura 9.** Microscopio con cámara de video incorporada.





**Figura 10.** Macho de raza Suri con hembra de raza Huacaya.

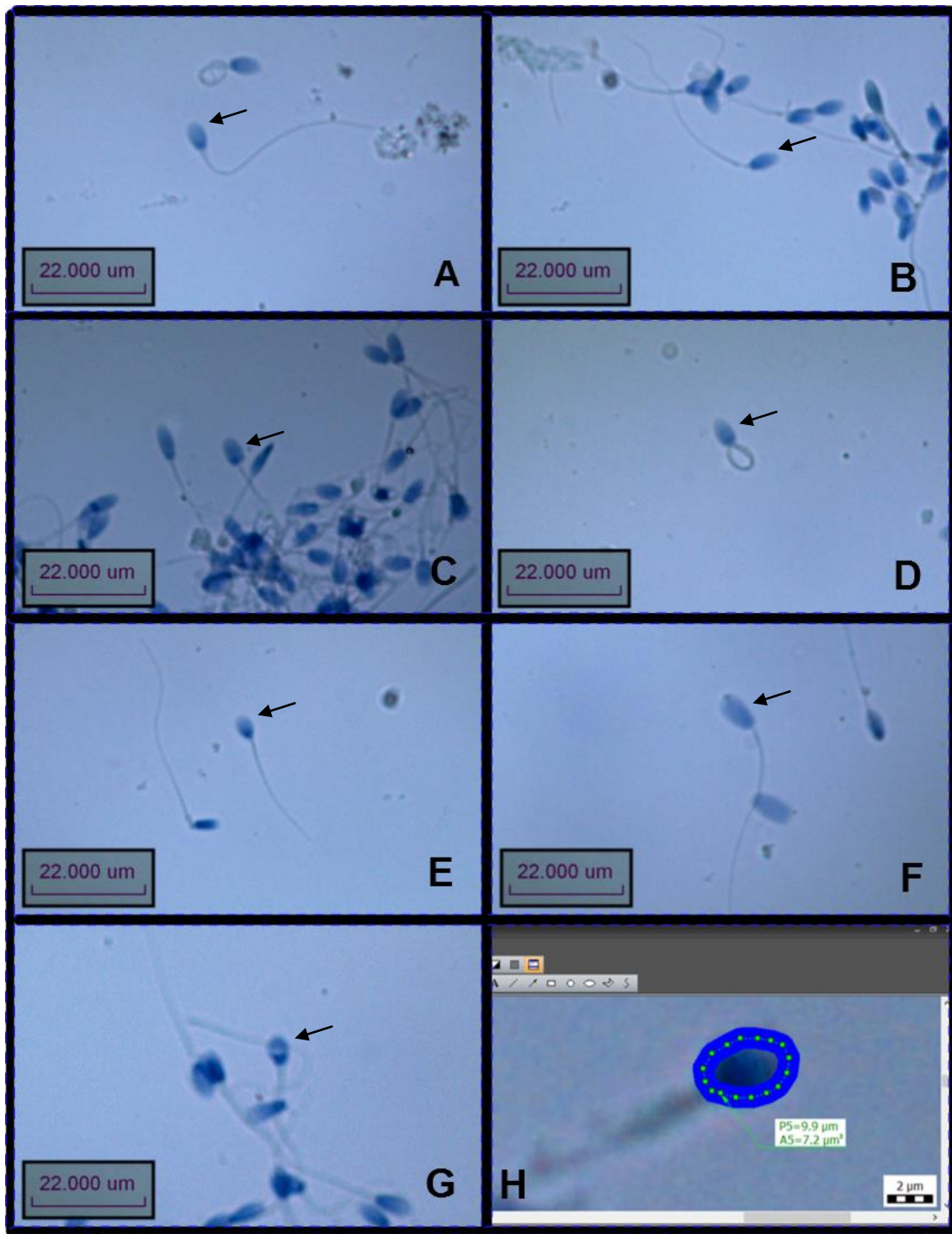


**Figura 11.** Procedimiento de eyaculación con la ayuda de un maniquí.

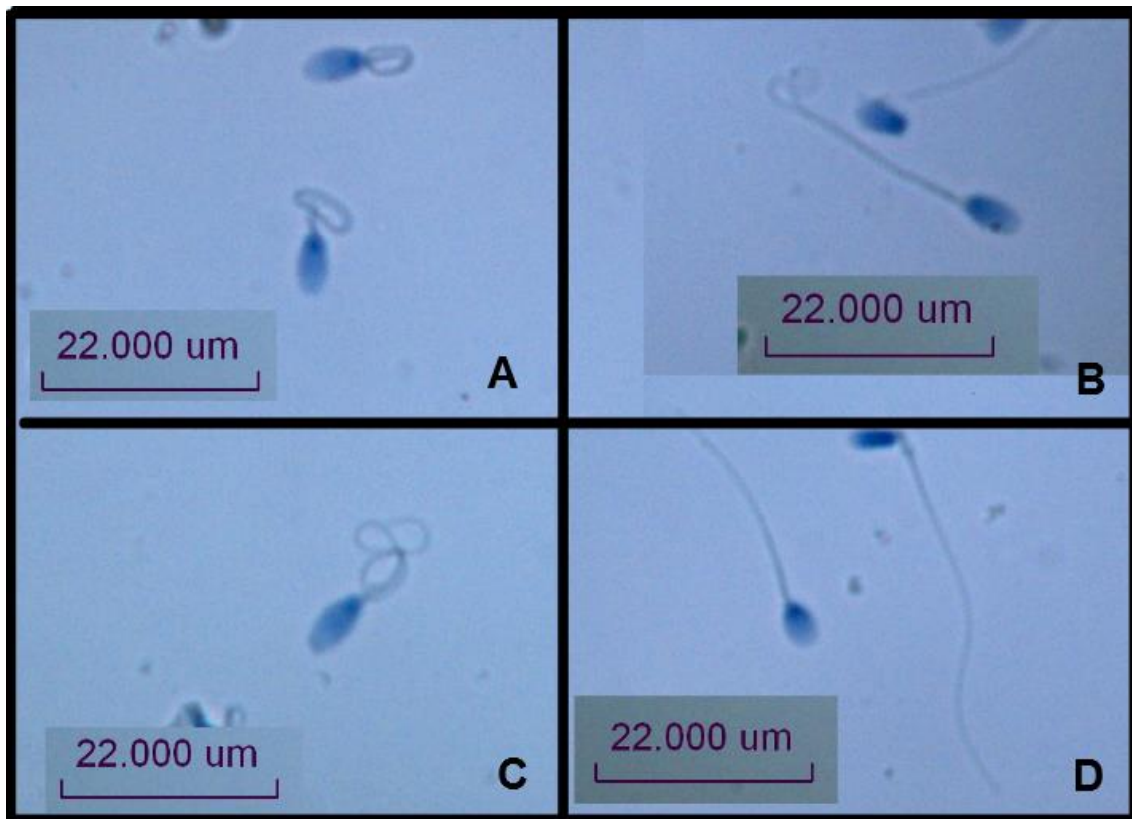




**Figura 12.** Semen recién colectado en diferentes volúmenes.



**Figura 13.** Formas de cabeza espermática (40X): Normal (A), Alargada (B), Corta (C), Piriforme (D), Redondeada (E), Macrocefalia (F), Microcefalia (G) y Parámetros morfométricos (H).



**Figura 14.** Tipos de defectos en cola y región media espermática (40X): Cola con 1 loop (A), cola con 2 loops (B), cola con 3 loops (C) y anomalía en la inserción de la región media (D).